

Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Biološki odsjek

Ines Lambert

**Utjecaj solnog i osmotskog stresa na glikozilaciju proteina
u kulturi tkiva kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff.**

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je u Laboratoriju za istraživanje proteina u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Biljane Balen, u sklopu znanstvenog projekta „Mehanizmi obrane biljke na abiotički stres: promjene proteoma uzrokovane sušom i povišenim salinitetom“ financiranog od Fonda za razvoj Sveučilišta u Zagrebu i predan je na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesor biologije.

Najljepše se zahvaljujem prof. dr. sc. Biljani Balen na pruženoj prilici da izradim ovaj rad. Posebno Vam neizmjereno zahvaljujem na svojoj pruženoj podršci i strpljenju.

Također, zahvaljujem dr. sc. Petri Cvjetko na vodstvu i podršci, te doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić na stručnim savjetima i pomoći.

Za Nikolu i Vedrana.

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

**UTJECAJ SOLNOG I OSMOTSKOG STRESA NA GLIKOZILACIJU
PROTEINA U KULTURI TKIVA KAKTUSA *Mammillaria gracilis* Pfeiff.**

Ines Lambert
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

U ovom su radu uspoređivani utjecaji solnog i osmotskog stresa na proteine izolirane iz kalusnog i tumorskog tkiva kaktusa vrste *Mammillaria gracilis* Pfeiff. uzgajanih u uvjetima *in vitro*. Budući da se radi o biljci sa CAM metabolizmom, koja je prilagođena na sušne uvjete staništa i osjetljiva na promjene u okolišnim čimbenicima, ona je prikladan modelni organizam za proučavanje mehanizama u biljnim stanicama koji se aktiviraju tijekom izlaganja biljaka solnom i osmotskom stresu. U ovom je istraživanju pokazano kako izlaganje tkiva vrste *M. gracilis* soli i manitolu mijenja ekspresiju ukupnih topivih staničnih proteina i izaziva promjene u njihovoj N-glikozilaciji, važnoj posttranslacijskoj modifikaciji proteina. Osmotski stres izazvan manitolom imao je jači utjecaj na N-glikozilaciju proteina kalusa, dok je na tumorsko tkivo veći utjecaj imao solni stres (NaCl). S obzirom da je uočena razlika u ekspresiji između glikoproteina kalusnog i tumorskog tkiva nakon izloženosti istom tipu abiotičkog stresa, može se zaključiti da je N-glikozilacija proteina specifična za određeni tip tkiva. S druge strane, razlika u ekspresiji glikoproteina unutar istog tipa tkiva, nakon izloženosti različitim vrstama stresora u podlozi (NaCl ili manitol), navodi na zaključak da stupanj glikozilacije ovisi o vrsti stresa kojoj je tkivo izloženo.

(56 stranica, 15 slika, 14 tablica, 102 literaturna navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: *Mammillaria gracilis* Pfeiff., solni stres, osmotski stres, N-glikozilacija

Voditelj: Dr. sc. Biljana Balen, prof.

Neposredni voditelj: Dr. sc. Petra Cvjetko

Ocjenitelji: Dr. sc. Biljana Balen, prof.
Dr. sc. Sandra Radić Brkanac, izv. prof.
Dr. sc. Damir Sirovina, v. pred.

Rad prihvaćen: 18. 09. 2019.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

INFLUENCE OF SALINITY AND OSMOTIC STRESS ON PROTEIN GLYCOSYLATION IN *Mammillaria gracilis* Pfeiff.

Ines Lambert
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

In this paper, the effects of salt and osmotic stress on proteins isolated from callus and tumour tissue lines of *Mammillaria gracilis* Pfeiff. cacti, grown *in vitro*, were compared. Because it is a plant with CAM metabolism adapted to arid habitats and sensitive to changes in environmental factors, it is a suitable model organism to study the mechanisms in plant cells that are activated during plant exposure to salt and osmotic stress. In this study, it was shown that the exposure of *M. gracilis* tissues to salt and mannitol alters the expression of total soluble cellular proteins and induces changes in protein N-glycosylation, a very important posttranslational modification. Osmotic stress induced by mannitol had stronger impact on callus protein N-glycosylation, while tumour tissue was found to be more sensitive to salt stress (NaCl). Difference in glycoprotein expression, which was found between callus and tumour tissue after their exposure to the same type of abiotic stress, brings to conclusion that N-glycosylation is specific to certain tissues type. On the other hand, difference in glycoprotein expression, detected within the same tissue type after exposure to different stressors (NaCl or mannitol), implies that level of protein N-glycosylation is dependent on the type of the stressor.

(56 pages, 15 figures, 14 tables, 102 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library

Key words: *Mammillaria gracilis* Pfeiff., salt stress, osmotic stress, N-glycosylation

Supervisor: Dr. Biljana Balen, Prof.

Assistant Supervisor: Dr. Petra Cvjetko

Reviewers: Dr. Biljana Balen, Prof.
Dr. Sandra Radić Brkanac, Assoc. Prof.
Dr. Damir Sirovina, Senior Lecturer

Thesis accepted: September 18, 2019

POPIS KRATICA I SIMBOLA

3,3-DAB	3,3-diaminobenzen
AA	akrilamid
BCIP/NBT	<i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium</i>
BIS	bisakrilamid
CAM	<i>Crassulacean Acid Metabolism</i>
Con A	konkavalin A
DIG-GNA	lektin izoliran iz visibabe (<i>Galanthus nivalis</i> L.), obilježen dioksigeninom
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
EtOH	etanol
HCl	klorovodična kiselina
MeOH	metanol
MS	hranidbena podloga (Murashige i Skoog 1962)
PVP	polivinil pirolidon
SDS	natrijev dodecil-sulfat
SDS-PAGE	poliakrilamid-gel elektroforeza uz dodatak SDS-a
SS pufer	Staples-Stahman ekstrakcijski pufer
TBS	pufer koji sadrži 20 mM Tris i 500 mM NaCl (<i>eng. Tris buffer saline</i>)
TEMED	N, N, N', N'-tetrametiletildiamin
Tris	tris[hidroksimetil]aminometan
TTBS	pufer TBS (<i>eng. Tris buffer saline</i>) koji sadrži 0,1% TWEEN-a 20® (v/v)

Sadržaj

1	UVOD	1
1.1	Utjecaj abiotičkog stresa na biljke.....	2
1.2	Solni stres i suša	5
1.2	Oksidacijski stres.....	7
1.3	Odgovori i mehanizmi obrane	8
1.4	Glikozilacija proteina kao odgovor na stres	9
1.5	Detekcija glikoproteina proteina primjenom lektina	12
1.6	Kaktus <i>Mammillaria gracilis</i> Pfeiff. i kultura tkiva.....	14
2	CILJ ISTRAŽIVANJA	15
3	MATERIJALI I METODE	17
3.1	Biljni materijal.....	18
3.2	Hranidbena podloga i uvjeti uzgoja biljnog materijala	18
3.3	Ekstrakcija topivih staničnih proteina	20
3.4	Određivanje koncentracije proteina u sirovim ekstraktima.....	21
3.5	Priprema proteinskih ekstrakata za analizu proteina tehnikama SDS-PAGE i <i>Western blotting</i>	22
3.6	Elektroforeza ukupnih topljivih proteina u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE) ...	23
3.7	Bojanje gelova srebrovim nitratom	25
3.8	Bojanje gelova bojom <i>Coomassie Brilliant Blue</i>	27
3.9	Mokri prijenos proteina na nitroceluloznu membranu	27
3.10	Otkrivanje N-glikoziliranih proteina na membrani lektinom konkavalin A	29
3.11	Otkrivanje N-glikoziliranih proteina na membrani lektinom GNA	29
4	REZULTATI.....	31
4.1	Ekspresija ukupnih topivih proteina u tkivu kaktusa nakon izlaganja solnom i osmotskom stresu.....	32

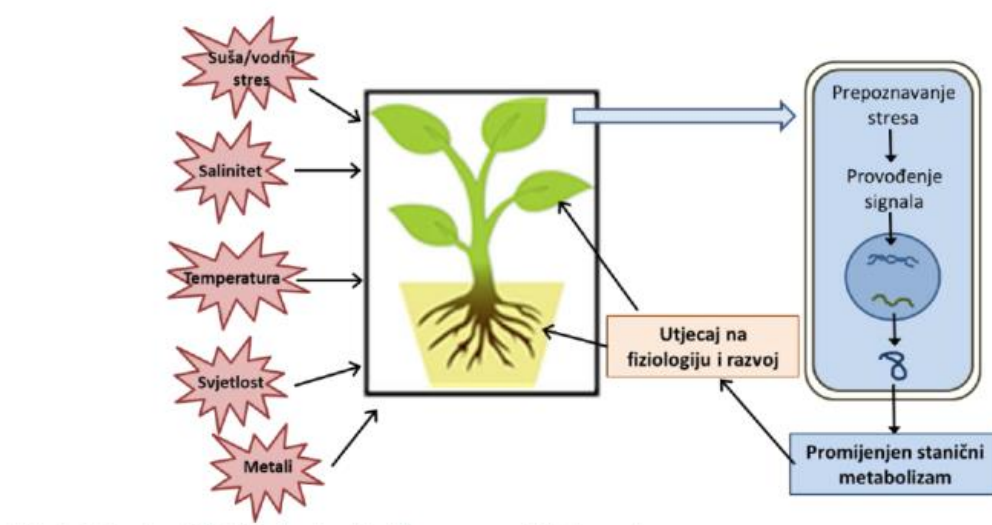
4.2	Glikoproteinski obrasci ukupnih topivih proteina u tkivu kaktusa nakon izlaganja solnom i osmotskom stresu	36
4.2.1	N-glikozilirani proteini detektirani lektinom konkavalin A	36
4.2.2	Proteini vezani na visoko-manozni tip N-glikana detektirani lektinom GNA	38
5	RASPRAVA	40
6	ZAKLJUČAK	44
7	LITERATURA.....	46
8	ŽIVOTOPIS	55

1 UVOD

1.1 Utjecaj abiotičkog stresa na biljke

Biljke su sesilni organizmi i nisu u mogućnosti napustiti svoje prirodno stanište, stoga su često su izložene različitim stresnim čimbenicima. Stres uzrokuju nepovoljni uvjeti koji ometaju ili inhibiraju normalno funkcioniranje metaboličkih procesa (Jones i Jones 1989). Biljka pokušava normalizirati nastalu neravnotežu i prilagoditi se (tolerancija na stres), što utječe na njen rast i razvoj, a može uzrokovati i smanjenje produktivnosti.

Razlikujemo biotički i abiotički stres. Biotički stres u biljaka definira se kao stres nastao uslijed napada kukaca i mikroorganizama (npr. patogenih gljiva i bakterija) te kompeticije s drugim organizmima. S druge strane, abiotički stres uzrokovan je negativnim učincima neživih čimbenika na žive organizme. Biljke mogu biti izložene različitim oblicima abiotičkog stresa, kao što su suša (Manavalan i sur. 2009), slana tla (Parvaiz i Satyawati 2008, Murillo-Amador 2001), hladnoća (Beck i sur. 2004), visoke temperature (Bita i Greats 2013), suboptimalne razine minerala, izloženost teškim metalima (Kalifa i sur. 2004a) i drugi (Slika 1).

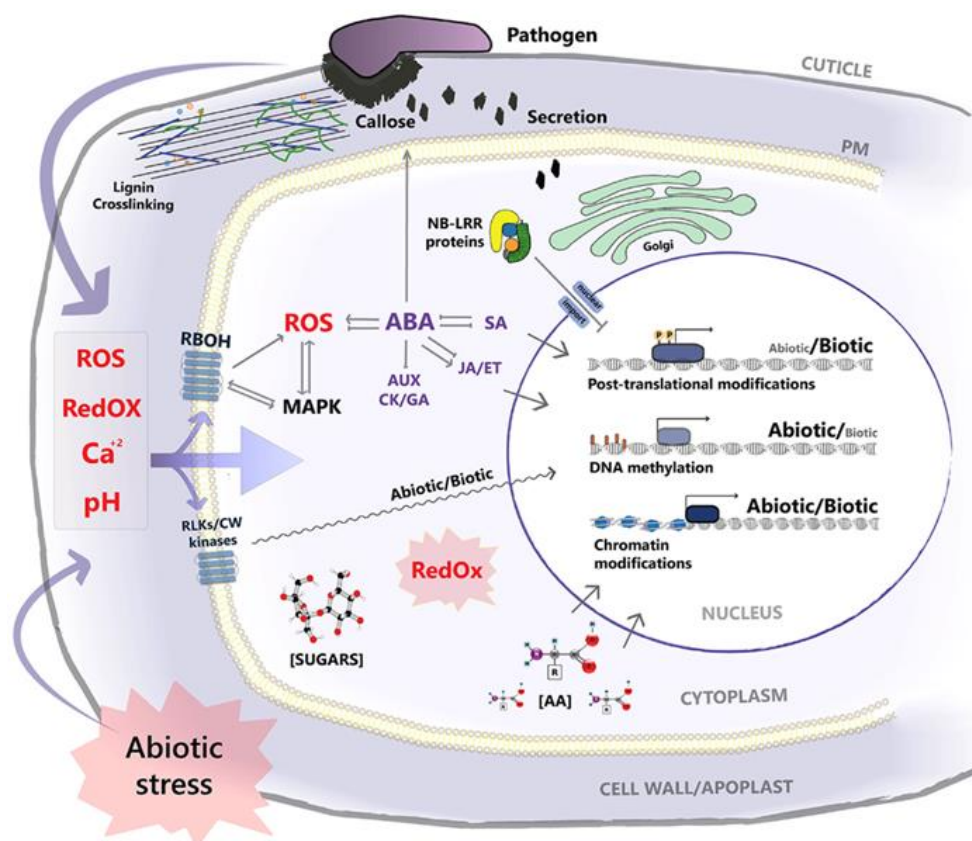


Slika 1. Utjecaj različitih čimbenika abiotičkog stresa. (preuzeto iz Balen 2016)

Biljke pokazuju određenu otpornost na stres. Mehanizmi koji biljci pomažu da preživi stresne uvjete su „izbjegavanje“ stresa (biljka može biti u fazi dormancije) i tolerancija na stres (npr. održavanje visoke metaboličke aktivnosti). Tolerancija se manifestira u obliku adaptacije ili aklimatizacije, podrazumijeva sposobnost biljke da se prilagodi iznenadnim nepovoljnim uvjetima, a da pritom ne bude značajnije oštećena (Clemens 2006). Reakcija

biljke na stres ovisi o karakteristikama stresnih čimbenika (trajanju, jačini i učestalosti izlaganja stresu) te o njihovoj međusobnoj kombinaciji, koja je normalno prisutna u prirodi. Isto tako, reakcija se razlikuje ovisno o biljnim karakteristikama (vrsta i svojstvo tkiva i organa, razvojni stadij i genotip) (Gaspar i sur. 2002, Reddy i sur. 2001).

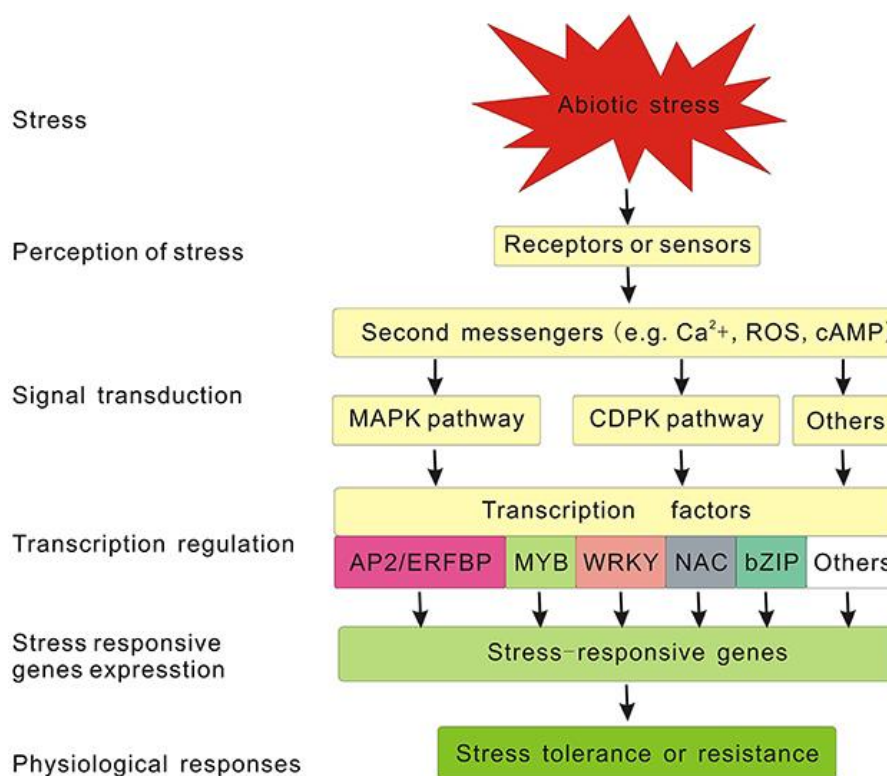
Odgovor na stres je iniciran kada biljka prepoznaje stres na staničnoj razini, a prepoznavanje stresa aktivira put prijenosa signala koji provode informaciju unutar pojedinačne stanice i kroz cijelu biljku (Slika 2). Nakon prepoznavanja i prenošenja signala slijedi indukcija gena vezanih za određeni odgovor za pojedinu vrstu stresa, a koja rezultira sintezom specifičnih proteina i metabolita. Promjene u ekspresiji gena mogu modificirati rast i razvoj te utjecati na reproduktivnu sposobnost biljke. U slučaju da je odgovor biljke neovisan o vrsti stresnog čimbenika koji ga je uzrokovao, govorimo o nespecifičnom odgovoru na stres. Tu se ubrajaju promjene u aktivnosti antioksidacijskih enzima (superoksid dismutaza, peroksidaza, glutathion reduktaza, dehidroaskorbat reduktaza, katalaza), zatim sinteza poliamina, stresnih metabolita i kompatibilnih osmotski aktivnih tvari (prolin, glicin betain, polioli), kao i sinteza i akumulacija antioksidansa (askorbinska kiselina, tokoferol, glutathion), sinteza regulatora rasta induciranih stresom (apscizinska kiselina, jasmonska kiselina, etilen) te promjene metabolizma (pojačano disanje, inhibicija fotosinteze) i membranskog transporta te sinteza stresnih proteina. U nekim slučajevima različiti stresni čimbenici mogu prouzrokovati slične ili čak identične mehanizme obrane (Sanità di Toppi i Gabbrielli 1999, Pevalek-Kozlina 2003).



Slika 2. Shematski prikaz signalnih putova koji se aktiviraju tijekom izlaganja biljne stanice biotičkom i/ili abiotičkom stresu (preuzeto iz Kissoudis i sur. 2014).

Indukciju stresnih gena reguliraju višestruki stresni signali, a neki od njih su transkripcijski faktori (Slika 3). Neki stresom inducirani geni kodiraju funkcionalne proteine koji su izravno uključeni u toleranciju na stres, dok ostali kodiraju regulatorne proteine, koji vjerojatno putem pozitivnih i negativnih povratnih informacija reguliraju odgovor biljke na stres. Istraživanje genoma biljke *Arabidopsis thaliana* doprinijelo je razjašnjavanju transkripcijske regulacije, posttranskripcijskih i posttranslacijskih modifikacija te epigenetičke regulacije pod utjecajem složenog abiotičkog stresa (Hirayama i Shinozaki 2010). Odgovor biljke na stres je vrlo složen, budući da uključuje mnoge gene i različite biokemijske i molekularne mehanizme, od kojih mnoge tek treba razjasniti. Geni koji sudjeluju u mehanizmima tolerancije na stres mogu se podijeliti u tri glavne skupine. Prvu skupinu čine geni uključeni u signalne kaskade i kontrolu transkripcije [MAP kinaze (eng. *mitogen-activated protein kinase*), fosfolipaze i dr.]. Drugu skupinu čine geni direktno uključeni u zaštitu biomembrana i proteina [proteini toplinskog šoka (eng. *heat shock proteins*, HSPs), šaperoni, proteini LEA (eng. *late embryogenesis abundant*, LEA),

osmoprotektanti i komponente antioksidacijskog odgovora], dok trećoj skupini pripadaju geni koji reguliraju primanje i prijenos vode i iona (akvaporini i transporteri iona). Svi ovi geni sudjeluju u mehanizmima koji osiguravaju održavanje homeostaze, zaštite i popravka oštećenih proteina i membrana. Neodgovarajući korak, ili više njih, u signalizaciji ili aktivaciji gena može nepovratno oštetiti proteine i membrane te dovesti do stanične smrti (Gaspar i sur. 2002).



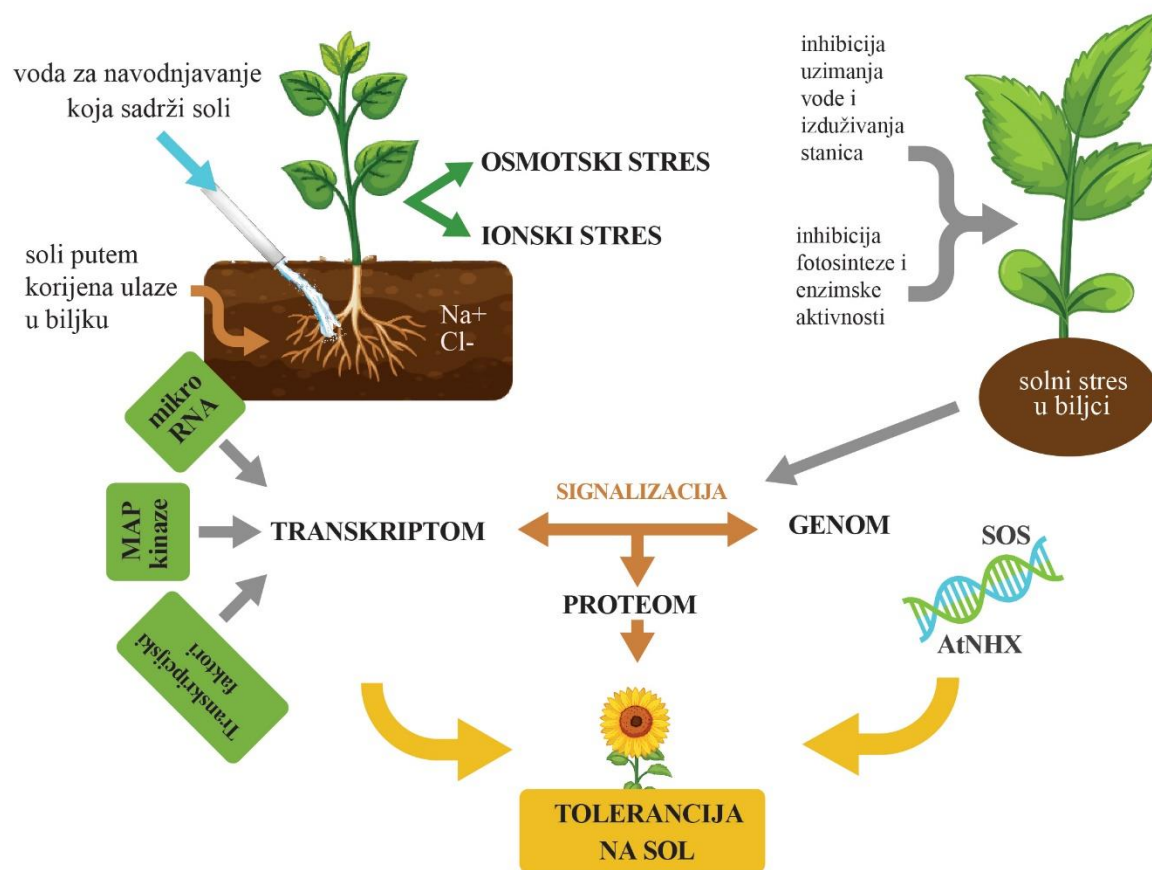
Slika 3. Signalni putevi uključeni u odgovor biljne stanice na abiotički stres (preuzeto iz Wang i sur. 2016).

1.2 Solni stres i suša

Salinitet i suša smatraju se glavnim abiotičkim faktorima stresa koji sinergistički utječu na smanjenje prinosa poljoprivrednih kultura diljem svijeta (Kalifa i sur. 2004a). Suša i povećani salinitet su često vezani (Kalifa i sur. 2004a) - vodni deficit vezan uz uporabu slane vode za navodnjavanje glavni je ograničavajući faktor u mediteranskoj regiji gdje su biljke izložene ekstremnom manjku vode tijekom sušne sezone (Kerepesi i Galiba 1992). Zbog velike količine isparavanja, a nedovoljnog ispiranja zbog male količine oborina, soli se

akumuliraju u tlu, što stvara zonu niskog vodnog potencijala te otežava biljkama uzimanje vode i hranjivih tvari. Solni stres tako u osnovi rezultira stanjem vodnog deficita u biljci i poprima oblik fiziološke suše (Mahajan i Tuteja 2005).

I suša i višak soli nameću osmotski stres biljkama, što rezultira dehidracijom stanica i osmotskom neravnotežom. Osim osmotskog učinka, slanost izaziva i ionski stres, do kojeg dolazi akumulacijom toksičnih iona. Solni stres uzrokuje inhibiciju rasta biljke putem redukcije u dostupnosti vode, akumulacije iona (Na^+ , Cl^- ili SO_4^{2-}) (Székely 2007) te uzrokovanja neravnoteže minerala. Svi ti procesi dovode do oštećenja biljke na staničnoj i molekularnoj razini (Slika 4). Biokemijski procesi koji tome posreduju uključuju degradaciju proteina, membranskih lipida, nukleinskih kiselina i klorofila (Silva-Ortega i sur. 2008).



Slika 4. Shematski prikaz toksičnog djelovanja solnog stresa i različitih načina na koje biljke reagiraju na izloženost ovom obliku abiotičkog stresa (preuzeto i prilagođeno iz Parihar i sur. 2015).

1.2 Oksidacijski stres

Kao posljedica abiotičkog stresa vrlo se često javlja sekundarni, oksidacijski stres, koji ima snažan utjecaj na rast i razvitak biljnog organizma te može smanjiti produktivnost biljaka za 65 do 87%, ovisno o biljnoj vrsti (Das i sur. 2015).

Oksidacijski stres definiran je kao pojava neravnoteže oksidansa i antioksidansa u smjeru oksidansa, što može uzrokovati štetu u stanici (Sies 1985). Oksidansi, koji u biljnoj stanici nastaju u procesu aerobnog metabolizma, skup su međuprodukata oksidacije vode do molekularnog kisika u fotosintetskom transportnom lancu elektrona (Arora i sur. 2002). Takvi međuprodukti tvore reaktivne kisikove spojeve (eng. *reactive oxygen species*, ROS) koji mogu biti slobodni radikali (hidroksilni, peroksilni i superoksidni) ili reaktivni neradikalni derivati (singletni kisik i vodikov peroksid) (Tablica 1).

Tablica 1. Reaktivni kisikovi spojevi (preuzeto iz Štefan i sur. 2007).

SLOBODNI RADIKALI	ČESTICE KOJE NISU SLOBODNI RADIKALI
Superoxidni radikal, $\cdot\text{O}_2^-$	Singletni kisik, $^1\text{O}_2$ (prvo pobuđeno singletno stanje)
Hidroksilni radikal, $\text{OH}\cdot$	Vodikov peroksid, H_2O_2
Peroksilni radikal, $\text{ROO}\cdot$	Ozon, O_3
Alkoksilni radikal, $\text{RO}\cdot$	Hipokloritna kiselina, HClO
Hidroperoksilni radikal, $\text{HO}_2\cdot$	

U uvjetima bez stresa antioksidacijski sustav učinkovito štiti stanicu od molekula ROS koje nastaju, no u stresnim uvjetima (suša, ekstremne temperature, prejak intenzitet svjetla, zaslanjenost tla, izloženost ozonu, aplikacija herbicida ili napad patogena) ravnoteža između oksidansa i antioksidansa može biti narušena te, ovisno o jačini oksidacijskog stresa, kapacitet antioksidacijskog obrambenog sustava može biti nedostatan za učinkovitu obranu. Umjereni oksidacijski stres aktivira antioksidacijski odgovor, pri čemu ROS ne služe samo

kao indikatori stresa stanice, nego i kao signalne molekule za ekspresiju gena uključenih u biosintezu antioksidacijskih enzima i drugih molekula uključenih u obranu biljke (Mittler 2002) no, ako je izloženost uzroku stresa dugotrajna i snažna, ROS mogu ući u oksidacijske ili redukcijske reakcije s molekulama DNA, proteinima, šećerima i lipidima, te na taj način uzrokovati oštećenja i utjecati na rast i metabolizam stanice (Esterbauer i sur. 1991). Održavanje razine ROS i prevencija oksidacijskih oštećenja stanice zadatak je slojevitog obrambenog sustava sačinjenog od enzimskih i neenzimskih antioksidansa (Halliwell i Gutteridge 1989, Sies 1997, Wang i sur. 2005).

1.3 Odgovori i mehanizmi obrane

Abiotički stres rezultira adaptivnim promjenama u biljnom proteomu, uključujući promjene u relativnoj zastupljenosti (ekspresiji) proteina, posttranslacijskim modifikacijama, protein-protein interakcijama te biološkim funkcijama proteina (Kosová i sur. 2018). Budući da se radi o sesilnim organizmima, biljke se oslanjaju na adaptivnost proteoma prilikom promjene ekoloških (i drugih) uvjeta. To uključuje promjene tijekom razvoja, promjene uslijed varijabilnih okolišnih uvjeta i tijekom obrane biljke od biotičkog i abiotičkog stresa (Kamal i sur. 2010). Sekvenciranjem genoma modelnih biljaka biolozi nastoje otkriti ulogu i funkciju određenih gena i njihovih produkata te utvrditi kako biološke makromolekule utječu na razvoj i različite funkcije određenog organizma (Cvjetko i sur. 2014). Proteini predstavljaju poveznicu između genoma i višestrukih staničnih aktivnosti. U genima je zapisan program razvitka i djelovanja živog organizma, a proteini su molekule koje ostvaruju taj genetički zapis. Da bi se informacija iz gena prevela u protein, treba se dogoditi niz važnih procesa u stanici kao što su transkripcija molekule mRNA, njezina dorada i transport iz jezgre u citoplazmu, translacija proteina, kontrola stabilnosti i kvalitete te njihov transport do krajnjeg odredišta u stanici, kao i posttranslacijske modifikacije koje osiguravaju proizvodnju aktivne i funkcionalne proteinske molekule (Balen 2016). Analize strukture i funkcije proteina mogu se izvoditi na razini proteoma, sekretoma i interaktoma.

U znanstvene discipline koje se bave analizom svih članova određene skupine bioloških molekula spadaju primjerice genomika, koja se bavi analizom gena; transkriptomika, koja proučava mRNA; metabolomika, koja se temelji na istraživanju kemijskih reakcija u kojima sudjeluju metaboliti specifičnih bioloških uzoraka; te proteomika, koja je relativno nova

grana molekularne biologije. Proteomika je znanost koja se bavi sustavnom analizom ekspresije proteina, tj. kvantitativnim, ali i kvalitativnim promjenama u ekspresiji proteina pod specifičnim uvjetima (Anderson i Anderson 1998, Kraljević Pavelić i Pavelić 2009). Proteomika utvrđuje, odnosno potvrđuje postojanje određene skupine gena karakterizacijom ekspresijskog profila proteoma, npr. tkiva biljke koja je bila izložena stresu u odnosu na tkivo kontrolne biljke, koja nije bila izložena istom stresnom čimbeniku ili usporedbom genotipova iste biljne vrste – onog koji je tolerantan i onog koji nije tolerantan na isti stresni čimbenik (Duressa i sur. 2011). Identifikacija proteina vodi do otkrića eksprimiranih gena koji igraju ulogu u mehanizmima tolerancije biljaka na stresne uvjete, pa istraživanja proteoma biljaka, osobito onih izloženih čimbenicima abiotičkog stresa, imaju veliki komercijalni potencijal (Salekdeh i sur. 2002).

Odgovor biljaka na različite stresne čimbenike može biti nespecifičan, odnosno neovisan o vrsti stresnog čimbenika koji ga je potaknuo, dok drugi čimbenici (npr. solni i osmotski stres) uzrokuju aktivaciju gena induciranih stresom koji tada kodiraju funkcionalne proteine izravno uključene u odgovor na stres, te uključuju gotovo sve aspekte biljnog metabolizma (Bray 1997; Hasegawa i sur. 2000; Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki 2000).

Velik broj gena reguliranih stresom kodiraju proteine čiju ulogu ne možemo predvidjeti iz njihovog slijeda aminokiselina (Aubourg i Rouze 2001; Bohnert i sur. 2001), te biološku aktivnost većine tih proteina tek treba ustvrditi (Ingram i Bartels 1996; Bray 1997; Hasegawa i sur. 2000), a razumijevanje puteva kojima ti proteini djeluju omogućit će razvoj biljaka sa poboljšanim svojstvima tolerancije solnog i osmotskog stresa (Kamal i sur. 2010).

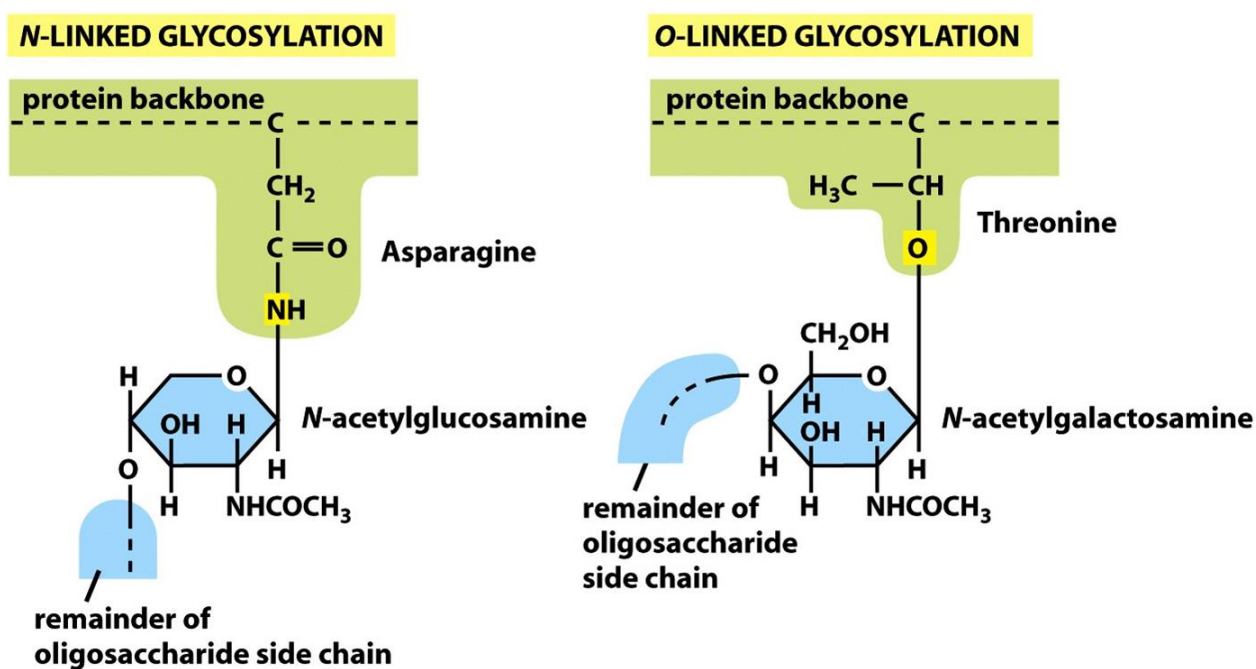
1.4 Glikozilacija proteina kao odgovor na stres

Posttranslacijske modifikacije ključan su mehanizam trenutačnog moduliranja biološke funkcije nekog proteina. Određena funkcija dodatkom posttranslacijske modifikacije može biti aktivirana ili utišana; dakle, analiza posttranslacijskih modifikacija je nužna je kako bismo detektirali stanje i funkcionalnost određenog proteina u uvjetima *in vivo* (Hirano i sur. 2004). Posttranslacijske modifikacije uključuju kovalentno vezane kemijske skupine, kao npr. fosforilacija, glikozilacija, acetilacija, ubikvinizacija, prenilacija i dr. (Park 2003).

Glikozilacija je esencijalna modifikacija proteina (Kelleher i Gilmore 2006; Yan i Lennarz 2005) i ima važnu ulogu u kotranslacijskom i posttranslacijskom smatanju proteina, njegovoj termičkoj stabilnosti, indukciji biološke aktivnosti te prepoznavanju i usmjeravanju proteina u odgovarajuće stanične odjeljke u eukariota.

Glikoproteine, obzirom na prirodu glikozidne veze koju tvore, dijelimo na:

- N-glikane, koji su preko N-acetilglukoamina (GlcNAc) vezani za Asn (u slijedu Asn-X-Ser/Thr, pri čemu X može biti bilo koja aminokiselina osim prolina i asparaginske kiseline), te
- O-glikane, vezane za Ser ili Thr (Slika 5).



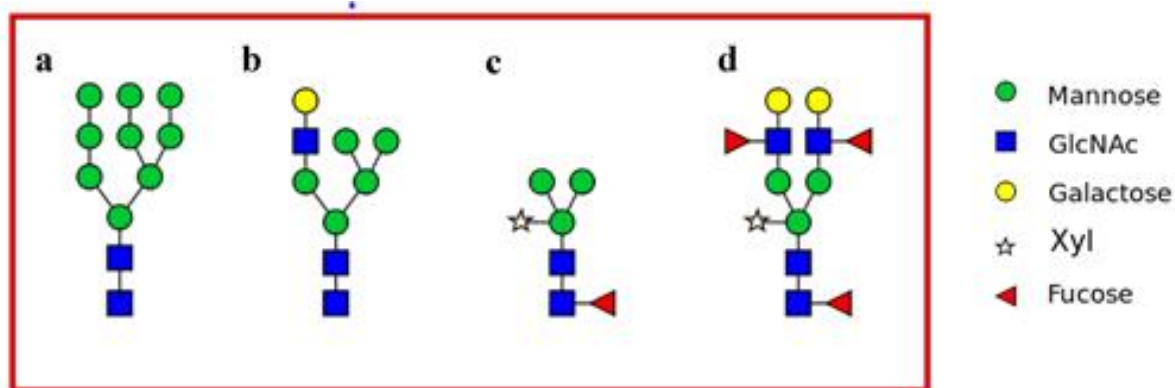
Slika 5. N- i O-glikozilacija proteina. (preuzeto iz Alberts i sur. 2008)

Biogeneza N-vezanih glikana započinje na citosolnoj strani endoplazmatskog retikuluma (ER), (Kornfeld i Kornfeld 1985) sintezom oligosaharidnog fragmenta vezanog na lipid (Glc₃Man₉GlcNAc₂), a koji se potom prebacuje na rastući polipeptidni lanac u ER-u. Kroz niz reakcija kataliziranih egzoglikozidazama, u endoplazmatskom retikulumu se sa lanca otcjepljuju glukoze, a u cis-Golgi kompartmentima manoze, čime nastaju glikani bogati

manozom. Biosinteza složenih glikana nastavlja se djelovanjem manozidaza i nekoliko glikozil-transferaza tijekom prolaska glikoproteina kroz sekretorni put (Schachter 1991).

Zbog steričkih ograničenja trodimenzionalne strukture glikoproteina, kao i razlike u kretanju glikoproteina i kompartmentalizacije enzima zaduženih za njihovo procesuiranje, nije nužno da se gore navedeni procesi sprovedu do kraja, što objašnjava velik dio velike heterogenosti N-glikanskih struktura u eukariota (Sturm i sur. 1987), dok je drugi razlog to što jedno proteinsko vezno mjesto može biti zauzeto većim brojem glikanskih struktura, što također dovodi do velike raznovrsnosti unutar populacije glikoproteina. Ipak, heterogenost eukariotskih struktura N-glikana nije nasumična, već ovisi o tipu stanice, fiziološkim uvjetima, i katkad, patogenim stanjima organizma (Sturm i sur. 1987, Kuster i sur. 1997).

Većina proteina koja prođu kroz sekretorni sustav biljne stanice vezani su za N-glikane jednog od 4 glavna tipa: hibridni, složeni, paucimanozni ili visoko-manozni (Slika 6). N-vezani glikani u stanici izvršavaju razne funkcije, koje možemo podijeliti u dvije skupine: unutar ER-a utječu na smatanje i sortiranje proteina, a po završetku stvaranja glikana u Golgijevom kompleksu su zaduženi za komunikaciju stanice sa okolinom (Mohorko i sur. 2011).



Slika 6. Tipovi N-glikana u biljnim stanicama: a) visoko-manozni; b) hibridni; c) paucimanozidni; i d) složeni N-glikani. (preuzeto iz Wikipedije; <https://w.wiki/8hZ>)

Glikozilacija proteina je kritična u smatanju proteina (eng. *folding*), važna za stabilnost proteina (bilo da djeluje protiv spontane denaturacije, bilo protiv ciljane proteolize), za stupanje proteina u specifične interakcije te za mobilnost proteina (povećavajući njegovu topljivost ili služeći kao signal za provjeru kvalitete u ER-u. Na fiziološkoj razini,

glikozilacija može služiti u svrhu prijenosa signala, staničnog prepoznavanja, vezanja proteina na membranu, mijenjanja ili aktivacije enzimske aktivnosti, okidanja specifičnih interakcija između proteina, itd. (Komatsu i sur. 2008, Roth i sur. 2012, Pan i sur. 2011, Ruiz-May i sur. 2012, Rayon i sur. 1998).

Istraživanja su pokazala da abiotički stres može rezultirati pojačanom N- i O-glikozilacijom proteina (Zhang i sur. 2009, von Schaewen i sur. 2008). Istovremeno, zapaženo je da u kulturama stanica i tkiva dolazi do promjene obrasca glikozilacije pojedinih proteina pri promjeni sastava hranidbene podloge (Andersen i Goochee 1994). Komatsu i sur. (2009) su analizirajući glikoproteine baze lista riže prethodno izložene hladnoći (5°C, 48 h) primijetili kako se smanjila ekspresija i glikozilacija kalretikulina, proteina koji je ključan za kontrolu kvalitete novosintetiziranih proteina. Također, mutacijom kompleksa oligosaharil transferaze (eng. *oligosaccharyltransferase complex*, OST) u vrsti *A. thaliana* pokazano je kako N-glikozilacija regulira toleranciju biljke na solni i osmotski stres (Koiwa i sur. 2003, Kang i sur. 2008) te utječe na razvoj biljke (Lerouxel i sur. 2005, Frank i sur. 2008, von Schaewen i sur. 2008).

1.5 Detekcija glikoproteina proteina primjenom lektina

Lektini su proteini koji na specifičan način prepoznaju ugljikohidrate, te se mogu reverzibilno vezati za monosaharide u glikoproteinima, pritom ih ne mijenjajući, a što čine putem interakcija domene koja veže određeni ugljikohidrat (eng. *Carbohydrate Recognition Domain*; CRD) i hidroksilnih, odnosno karboksilnih skupina šećera. Specifičnost lektina određena je oblikom veznog mjesta i slijedom aminokiselina koje se vežu na ugljikohidrat te omogućuje brzo i pouzdano određivanje sastava oligosaharida vezanog na protein.

Lektine proizvode i biljne i životinjske stanice te je izrazito velik broj lektina izoliran, kako iz biljnih tkiva, tako i drugih organizama. Osim što mogu reagirati sa monosaharidima već u milimolarnim količinama šećera, specifično se i vežu na α - ili β -anomer određenog šećera (Cummins i sur. 2015), stoga su izrazito koristan alat za detekciju N- i O-glikana iz različitih vrsta stanica jer sa velikom preciznošću mogu detektirati određeni glikoepitop (Tablica 2).

Konkavalin A (Con A) je lektin izoliran iz biljke *Canavalia ensiformis*, koji se sa visokim afinitetom i specifičnošću veže za N-vezanu α -D-manozu, sastavni dio središnje strukture svih N-glikana, (te s manjim afinitetom za α -D-glukozu), stoga je njime moguće otkriti sve N-glikozilirane proteine u proteinskom ekstraktu. Lektin GNA (iz vrste *Galanthus nivalis*) koristi se za karakterizaciju glikanske komponente glikoproteina, odnosno prepoznaje visokomanozni tip N-glikana, tj. terminalne manoze.

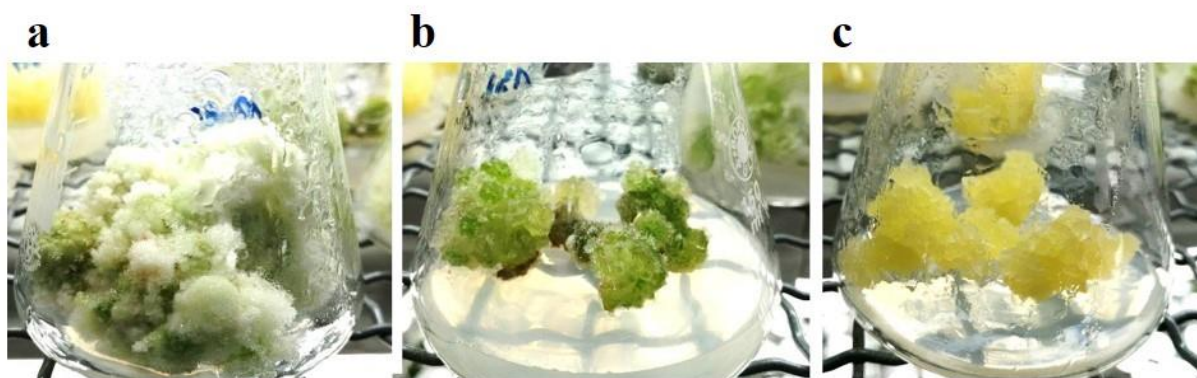
Tablica 2. Neki od najčešće rabljenih lektina za detekciju N- i O-vezanih glikana iz glikoproteina na nitroceluloznoj ili PVDF membrani (Balen i sur. 2011).

Lektin	Izvor lektina	Specifičnost prema monosaharidu	Napomena o vezanju
Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	α -D-Glu α -D-Man	Prepoznaje središnju strukturu N-glikana
RCA I	<i>Ricinus communis</i>	β -D-Gal β -D-GalNAc	Prepoznaje terminalnu Gal vezanu β -(1,4) vezom.
SNA	<i>Sambucus nigra</i>	β -D-Gal	Prepoznaje sijalinsku kiselinu vezanu (2,6) vezom na Gal
UEA	<i>Ulex europaeus</i>	α -D-Fuc	Prepoznaje oligosaharide sa terminalnom α -Fuc
PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	β -Gal-(1,3)-GalNAc	Prepoznaje O-glikane
MAA	<i>Maackia amurensis</i>	SA	Prepoznaje sijalinsku kiselinu vezanu (2,3) vezom na Gal
DSA	<i>Datura stramonium</i>	GlcNAc	Prepoznaje Gal-(1,4)-GlcNAc u složenom i hibridnom tipu N-glikana
GNA	<i>Galanthus nivalis</i>	α -D-Man	Detekcija visoko-manoznog tipa N-glikana

1.6 Kaktus *Mammillaria gracilis* Pfeiff. i kultura tkiva

Kulture tkiva i stanica mogu poslužiti kao koristan alat za proučavanje mehanizama tolerancije na sol jer omogućavaju relativno brze reakcije i kratko generacijsko vrijeme (Zhang 2004), no određeni je broj autora ustvrdio kako postoji niz fizioloških, epigenetičkih i genetičkih problema vezanih uz održavanje kulture tkiva ili stanica u uvjetima *in vitro*, kao što su primjerice gubitak organogenog potencijala, hiperhidriranost i somaklonske varijacije, a od kojih su neki, osim genotipski, uvjetovani i postojanjem izvora oksidacijskog stresa u podlozi, kao što su visoka razina soli, nedostatak minerala, osmotski stres itd. (Mangolin i sur. 1997, Gribble 1999, Cassells i Curry 2011).

Kao sukulentne biljke s CAM (eng. *Crassulacean Acid Metabolism*) metabolizmom, kaktusi su posebno osjetljivi na uvjete kulture tkiva za koju su karakteristična visoka vlažnost i podloga bogata nutrijentima (Malda i sur. 1999). Kao rezultat toga, kaktus *Mammillaria gracilis* u uvjetima *in vitro* može preći iz organiziranog u neorganizirani oblik rasta, i, osim morfološki normalnih, razviti i habituirane (neosjetljive na dodatak hormona rasta; Slika 7a) te hiperhidrirane kaluse (Slika 7b), koji se mogu uspoređivati s tumorskim stanicama (Slika 7c) jer, kao i tumori, zadržavaju meristemske (totipotentne) osobine, što ih čini dobrim sustavom za proučavanje diferencijacije stanica i razvoja biljaka (Krsnik-Rasol i Balen 2001, Balen 2002).



Slika 7. Kultura tkiva kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff; a) kalusno tkivo; b) hiperhidrirano kalusno tkivo; i c) tumorsko tkivo.

2 CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj rada bio je utvrditi djelovanje solnog i osmotskog stresa na ekspresiju ukupnih topivih proteina kao i na njihovu glikozilaciju u kalusnom i tumorskom tkivu kaktusa *Mammillaria gracilis* Pfeiff. nakon izlaganja djelovanju natrijevog klorida i manitola primijenjenih u različitim koncentracijama.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Biljni materijal

U istraživanju je korišteno svježe kalusno i tumorsko tkivo vrste *Mammillaria gracilis* Pfeiff. (porodica *Cactaceae*) subkultivirano u uvjetima kulture tkiva u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Habituirana kalusna linija nastala je odvajanjem spontano formiranih kalusa od matičnih biljaka te njihovom subkultivacijom na svježoj podlozi MS (Murashige i Skoog 1962), bez dodataka regulatora rasta u periodima od tri tjedna.

Tumorska linija inducirana je sojem B6S3 bakterije *Agrobacterium tumefaciens* putem prijenosa bakterijske suspenzije na eksplantate izdanaka kaktusa, a održavana je kao stabilna tumorska linija koja nikad nije pokazivala organogeni potencijal (Balen 2001).

3.2 Hranidbena podloga i uvjeti uzgoja biljnog materijala

Tkiva su rasla na osnovnoj hranidbenoj podlozi MS, čiji je sastav prikazan u Tablici 3.

Tikvice za uzgoj volumena 100 mL sam 20 minuta sterilizirala u sušioniku na 100 °C. Potom sam u svaku tikvicu ulila 30 - 40 mL hranidbene podloge; u tikvice namijenjene za tretman tkiva dodala sam NaCl i manitol do finalnih koncentracija od 150, 250 i 350 mM NaCl te 300, 500 i 700 mM manitola. Potom sam dodavanjem 1,0 M KOH ujednačila pH podloga na pH 5.8. U tikvice s podlogama za uzgoj kontrolnog tkiva nisam dodavala NaCl i manitol. Tikvice sam začepila vatom i prekrila aluminijskom folijom, te skupa sa priborom za nasađivanje autoklavirala 18 minuta pri temperaturi od 121 °C i tlaku od 150 kPa (autoklav *Astell scientific*, Velika Britanija).

Nakon što su podloge u tikvicama ohlađene, na njih sam presadila eksplantate kalusnog i tumorskog tkiva u komori sa horizontalnim strujanjem sterilnog zraka; tikvice sam potom začepila vatom i aluminijem te prenijela u klima-komoru (24 ± 2 °C, fotoperiod od 16/8 h svjetla/tame dnevno pod fluorescentnom svjetlošću jakosti $90 \mu\text{Es}^{-1}\text{m}^{-2}$).

Tablica 3. Sastav hranidbene podloge MS (Murashige i Skoog 1962).
pH podloge je iznosio 5.8.

MS PODLOGA, 1 L	
MAKROELEMENTI	mg/L
amonijev nitrat, NH_4NO_3 (Kemika, Hrvatska)	1650,000
dihidrat kalcijevog klorida, $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)	440,000
heptahidrat magnezijevog sulfata, $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)	370,000
kalijev dihidrogen fosfat, KH_2PO_4 (Kemika, Hrvatska)	170,000
kalijev nitrat, KNO_3 (Kemika, Hrvatska)	1900,000
MIKROELEMENTI	mg/L
bakrov sulfat pentahidrat, $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)	0,025
borna kiselina, H_3BO_3 (Kemika, Hrvatska)	6,200
cinkov sulfat heptahidrat, $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)	8,600
kalijev jodid, KI (Kemika, Hrvatska)	0,830
kobalt (II) klorid heksahidrat, $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)	0,025
manganov sulfat tetrahidrat, $\text{MnSO}_4 \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)	16,900
natrijev EDTA dihidrat, $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)	37,300
natrijev molibdat, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)	0,250
nikotinska kiselina (Kemika, Hrvatska)	0,500
ORGANSKI DODACI	mg/L
piridoksin-HCl, vitamin B6 (Kemika, Hrvatska)	0,500
tiamin-HCl, vitamin B1 (Kemika, Hrvatska)	0,100
željezo (II) sulfat heptahidrat, $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Hrvatska)	27,800
OSTALI DODACI	g/L
agar (Sigma, SAD)	8,000
glicin (Sigma, SAD)	0,002
mio-inozitol (Kemika, Hrvatska)	0,100
saharoza (Kemika, Hrvatska)	30,000

3.3 Ekstrakcija topivih staničnih proteina

Nakon rasta biljnih tkiva na podlogama tijekom 7, odnosno, 14 dana, tkivo sam izvadila, umotala u aluminijsku foliju, te smrznula kratkim potapanjem u tekući dušik (Mess, Hrvatska). Potom sam u aluminijskoj foliji probušila nekoliko rupica sa obje strane i stavila tkiva u vakuum-liofilizator (model Alpha 1-2 LD, Christ, Osterode, Njemačka), kako bi se iz njih desorbirala i sublimirala voda. Liofilizaciju sam provodila a u trajanju od 24 h, pri temperaturi od 64 °C i tlaku od 0.025 mbara.

Liofilizirano tkivo sam usitnila u tarioniku i stavila u sušionik na 1 h, pri temperaturi od 85 °C. Nakon vađenja iz sušionika, tkiva sam izvagala do mase od 0,5 g te potom homogenizirala u tarioniku uz dodavanje tekućeg dušika. Tijekom čitavog postupka pribor i biljni materijal bili su hlađeni ledom. Nakon usitnjavanja tkiva u tekućem dušiku, u tarionik sam dodala 1,5 mL ohlađenog Staples-Stahman pufera za ekstrakciju proteina (Tablica 4). Prilikom ekstrakcije proteina dodala sam i malu količinu (navrh spatule) polivinil pirolidona (PVP) koji ima ulogu stabilizatora tj. veže na sebe fenole i alkaloidne kojima su bogata biljna tkiva.

Dobiveni homogenat prenijela sam u prethodno ohlađene tubice za centrifugiranje te razdvojila topivu frakciju centrifugiranjem 15 min na 14 000 rpm pri +4 °C. Supernatant sam potom prenijela u čiste tubice i ponovno centrifugirala 60 min na 14 000 rpm pri +4 °C. Tako dobiveni supernatant razdvojila sam na dva alikvota te jedan čuvala na -80 °C, a onaj za skorašnju uporabu na -20 °C.

Tablica 4. Sastav Staples-Stahmanovog ekstrakcijskog pufera.

Tvar	m (g)
askorbinska kiselina	0,20
cistein hidroklorid, Cistein-HCl (Merck, Njemačka)	0,20
saharoza (Kemika, Hrvatska)	34,20
Tris	2,42
6 M klorovodična kiselina, HCl (Kemika, Hrvatska)	do pH 8,0
reH ₂ O	do 200 mL

3.4 Određivanje koncentracije proteina u sirovim ekstraktima

Koncentraciju proteina u sirovom ekstraktu mjerila sam spektrofotometrijski pomoću metode po Bradfordu (1976), koja koristi pomak apsorpcijskog maksimuma boje *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250 (Sigma, SAD) pri njenom vezanju na proteinski supstrat u kiselom mediju. Slobodna boja posjeduje apsorpcijski maksimum pri 465 nm, a u vezanom obliku pri 595.

Koncentracija ispitivanog proteina računa se pomoću baždarnog pravca konstruiranog mjerenjem apsorbancije otopina s različitim koncentracijama proteinskog standarda, a za koji se rutinski rabi niz razrjeđenja goveđeg serumskog albumina (eng. *bovine serum albumine*, BSA), u ekstrakcijskom puferu poznate koncentracije.

Kako bih nulirala instrument koristila sam 1 mL Bradfordovog reagensa u koji je dodano 20 µL Staples-Stahman pufera za ekstrakciju proteina.

Bradford radna otopina pripremljena je od Bradford stock otopine (Tablica 5) čuvana je u tamnoj boci na sobnoj temperaturi do nekoliko tjedana. Otopina je povremeno filtrirana korištenjem filter-papira Whatman No.1 kako bi se uklonio precipitat.

Tablica 5. Sastav radne otopine za test po Bradfordu.

BRADFORD REAGENS, 500 mL	
95% etanol (Kemika, Hrvatska)	15 mL
88% fosfatna kiselina, H ₃ PO ₄ (Kemika, Hrvatska)	30 mL
Bradford stock otopina	30 mL
reH ₂ O	425 mL
BRADFORD STOCK OTOPINA, 300 mL	
96% etanol	100 mL
88% H ₃ PO ₄	200 mL
boja <i>Coomassie brilliant blue</i> (CBB) G-250	350 mg

3.5 Priprema proteinskih ekstrakata za analizu proteina tehnikama SDS-PAGE i Western blotting

Kako bi se proteini mogli razdvojiti elektroforezom u denaturirajućim uvjetima, proteinske sam ekstrakte pomiješala sa puferom za denaturaciju (Laemmli 1970) u omjeru ne manjem od 1(pufer):4 (uzorak). Sastav pufera za denaturaciju nalazi se u Tablici 6.

Kako bi se proteini u potpunosti denaturirali, uzorke sam inkubirala 5 minuta u termostatiranoj miješalici (*Eppendorf*, Njemačka) na 95 °C pri 400 rpm. Uzorke sam zatim centrifugirala na 8000 rpm u trajanju od 3 min (u centrifugi model 5417R, *Eppendorf*, Njemačka), prebacila ih u čiste tubice i pohranila na 4 °C ili -20 °C.

Tablica 6. Sastav pufera za denaturaciju (*Laemmli sample buffer*). Pripremiti i rabiti u digestoru, čuvati na +4 °C.

Tvar	V (mL)
glicerol (Kemika, Hrvatska)	8,00
20% SDS (Sigma, SAD)	5,00
0,5 M Tris – HCl; pH 6,8 (Sigma, SAD)	6,25
β-merkaptetanol (Sigma, SAD)	2,50
0,5% bromfenol-plavo (Sigma, SAD)	0,50
reH ₂ O	do 25 mL

3.6 Elektroforeza ukupnih topljivih proteina u denaturirajućim uvjetima (SDS-PAGE)

Budući da na razdvajanje makromolekula u električnom polju dominantan utjecaj imaju njihova masa, naboj i topologija, te da proteini posjeduju funkcionalne skupine koje pri određenom pH proteinu daju negativni, pozitivni (ili 0, ukoliko je pH jednaka pI za dani protein) ukupan naboj, za razdvajanje proteina u električnom polju na temelju mase se koristi natrijev dodecilsulfat - poliakrilamid gel elektroforeza (eng. *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*; SDS-PAGE), metoda elektroforeze u poliakrilamidnom gelu pri kojoj se anionski detergent natrijev dodecil sulfat (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) jednoliko veže na prisutne proteinske vrste u uzorku te uzrokuje denaturaciju proteina i dovodi do toga da sve proteinske vrste posjeduju isti omjer naboja i mase. Uslijed jednakog omjera mase i naboja omogućena je procjena relativnih molekulskih masa proteina na osnovu njegove pokretljivosti u gelu.

Između stakalaca za elektroforezu ulila sam otopinu gela za razdvajanje (Tablica 7), koju sam nadsvodila slojem destilirane vode, kako bih spriječila inhibiciju polimerizacije atmosferskim kisikom. Gel sam ostavila da se polimerizira na sobnoj temperaturi 30 min. Nakon polimerizacije, odlila sam vodu te ulila otopinu gela za sabijanje (Tablica 7) do gornjeg ruba stakalaca, te umetnula češalj za oblikovanje jažica. Po završetku polimerizacije, jažice sam isprala s reH₂O.

Tablica 7. Sastav gelova za SDS-PAGE u Mini - PROTEAN II sustavu (BioRad, SAD).

GEL ZA KONCENTRIRANJE, 4%	
reH ₂ O	3,050 mL
0,5 M Tris – HCl; pH 6,8	1,250 mL
Akrilamid, AA (Sigma, SAD)	665,000 µL
30% Bisakrilamid, Bis (Sigma, SAD)	665,000 µL
10% SDS	50,000 µL
10% amonij peroksodisulfat, APS (Gram-Mol, Hrvatska)	35,000 µL
tetrametiletilendiamin, TEMED (Sigma, SAD)	8,000 µL
GEL ZA RAZDVAJANJE, 12%	
reH ₂ O	3,350 mL
1,5 M Tris – HCl; pH 8,8	2,500 mL
Akrilamid, AA	4,000 mL
30% Bisakrilamid, Bis	4,000 µL
10% SDS	100,000 µL
10% amonij peroksodisulfat, APS	50,000 µL
tetrametiletilendiamin, TEMED	5,000 µL
ELEKTRODNI PUFER ZA SDS PAGE, KONCENTRIRAN 10 × (pH 8,3)	
glicin (Sigma, SAD)	144 g
SDS	10 g
Tris	30 g
6 M HCl	do pH 8,3
reH ₂ O	do 1 L

Denaturirane proteinske ekstrakte sam nanijela u jažice u odgovarajućim volumenima, tako da masa proteina po jažici bude 10 µg. Kao pozitivnu kontrolu za lektine Con A i GNA koristila sam glikoprotein karboksipeptidazu Y, a fetuin kao negativnu kontrolu za GNA. U Tablici 8 nalaze se volumeni nanesenih uzoraka.

Tablica 8. Volumeni uzoraka nanieseni na gel za elektroforezu (mL).

	KY	F	M	K	1	2	3	4	5	6
K7	5,0	5,0	5,0	8,5	7,3	8,0	8,5	8,0	8,0	8,5
K14	5,0	5,0	5,0	20,0	14,5	11,0	20,0	12,5	12,5	11,0
T7	5,0	5,0	5,0	12,5	12,5	20,0	16,5	11,0	16,5	20,0
T14	5,0	5,0	5,0	9,0	9,0	8,3	11,0	11,0	9,0	11,0

KY – karboksipeptidaza Y, F – fetuin; M – biljeg molekulskih masa; K – kontrola; K7 – kalusno tkivo tretirano 7 dana, K14 – kalusno tkivo tretirano 14 dana; T7 – tumorsko tkivo tretirano 7 dana; T14 – tumorsko tkivo tretirano 14 dana.

Ukupne sam topive stanične proteine razdvojila SDS-PAG elektroforezom u sustavu Mini - Protean II. Prvih 15 minuta elektroforeza je tekla pri konstantnom naponu od 100 V kako bi se uzorci koncentrirali u gornjem gelu za sabijanje, a potom, do kraja, pri 200 V.

3.7 Bojanje gelova srebrovim nitratom

Proteine razdvojene SDS-PAG elektroforezom obojila sam srebrovim nitratom (AgNO_3) prema metodi koju su opisali Blum i sur. (1987). Nakon elektroforeze, gelovi se u otopini za fiksiranje moraju inkubirati minimalno 1 sat, pri 4 °C. Nakon fiksiranja, gelove sam ispirala 3×20 min u 20 mL 30%-tnog etanola, te ih onda 1 minutu inkubirala u otopini za obradu prije impregnacije. Nakon toga sam ih 3×20 s isprala s reH_2O , te ih 20 min impregnirala u otopini srebrovog nitrata, nakon čega su slijedila još 2 ispiranja s reH_2O u trajanju od 20 s. Nakon toga sam ih uronila u otopinu za razvijanje sve dok se nisu do pojavile vidljive vrpce, te sam tada sa gelova odlila otopinu za razvijanje i ulila stop otopinu.

Tablica 9. Sastav slijeda otopina korištenih pri bojanju proteina srebrovim nitratom.

Količine otopina u ovoj tablici dostatne su za obradu 4 gela.

OTOPINA ZA FIKSIRANJE	
etanol	500,0 mL
octena kiselina, CH ₃ COOH (Kemika, Hrvatska)	120,0 mL
37% formaldehid, HCOH (Kemika, Hrvatska)	0,5 mL
deH ₂ O	do 1 L
OTOPINA ZA OBRADU PRIJE IMPREGNACIJE	
natrijev tiosulfat, Na ₂ S ₂ O ₃ × 5 H ₂ O (Kemika, Hrvatska)	40 mg
reH ₂ O	do 200 mL
OTOPINA ZA IMPREGNACIJU	
srebrov nitrat, AgNO ₃ (Kemika, Hrvatska)	400 mg
37% formaldehid	1,5 mL
reH ₂ O	do 200 mL
OTOPINA ZA RAZVIJANJE	
natrijev karbonat, Na ₂ CO ₃ (Kemika, Hrvatska)	12 g
37% formaldehid	1 mL
otopina za obradu prije impregnacije	4 mL
reH ₂ O	do 200 mL
STOP - OTOPINA	
etanol	500 mL
octena kiselina	120 mL
deH ₂ O	380 mL

3.8 Bojanje gelova bojom *Coomassie Brilliant Blue*

Kako bih vizualizirala gelove bojom CBB, pripremila sam otopinu za bojanje prema Tablici 10. Gelovi su u otopini bili inkubirani na tresilici preko noći na sobnoj temperaturi, a sljedeći dan sam ih odbojavala inkubacijom u otopini za odbojavanje, uz povremenu promjenu otopine za odbojavanje, sve do zadovoljavajuće razine obezbojenja pozadine, odnosno dobre vidljivosti proteina. Otopina za odbojavanje je istog sastava kao i otopina za bojenje, osim što ne sadrži boju. Nakon odbojavanja, gelove sam čuvala u deH₂O, na 4°C.

Tablica 10. Sastav otopine za bojanje bojom CBB.

octena kiselina	10 mL
metanol	40 mL
deH ₂ O	50 mL
CBB G-250 (Sigma, SAD)	10 mg

3.9 Mokri prijenos proteina na nitroceluloznu membranu

Po završetku elektroforeze, pripremila sam sustav za prijenos proteina (*Western blotting*) na nitroceluloznu membranu u vertikalnom sustavu za elektroprijenos (*Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell*, Biorad, SAD) tako da je između membrane i gela bilo čim manje mjehurića zraka i da je membrana bila na strani pozitivne elektrode.

Prijenos je izveden uz pomoć pufera za prijenos (Tablica 11), te je cjelokupni prijenos pri naponu od 60 V trajao 60 min.

Tablica 11. Sastav pufera za prijenos (28 mM Tris, 192 mM glicin; 10 % metanol).

Tris	3,35 g
glicin	14,40 g
metanol	100 mL
6 M HCl	do pH 8,3
deH ₂ O	do 1 L

Kako bih provjerila kvalitetu prijenosa proteina, po završetku prijenosa sam membrane kratko (1-2 minute) inkubirala u otopini boji *Rouge Ponceau S* (koja se neselektivno i reverzibilno veže za sve proteine), a zatim ispirala u reH₂O sve dok proteinske vrpce nisu bile dobro razlučive, a pozadina nebojena. Mekom grafitnom olovkom sam obilježila mjesta biljega molekulskih masa.

Potom sam membranu još jednom isprala sa reH₂O, a onda do potpunog odbojenja i u elektrodnom puferu (eng. *Tris Buffered Saline*, TBS) (Tablica 12), nakon čega sam ju, (kako se lektin ne bi nespecifično vezao za slobodna mjesta na membrani) ostavila da se inkubira i blokira u puferu TBS s dodatkom detergenta Tween 20 (TTBS) (Tablica 13) preko noći, pri temperaturi od +4 °C.

Tablica 12. Sastav TBS pufera koncentriranog 10 puta i jedan put.

PUFER 10 × TBS, 1 L (0,2 M Tris; 0,73 M NaCl)	
Tris	24,20 g
NaCl	80,00 g
6 M HCl	do pH 7,6
deH ₂ O	do 1 L
PUFER 1 × TBS, 1 L	
10 × TBS	100 mL
deH ₂ O	900 mL

Tablica 13. Sastav TTBS pufera i TTBS pufera sa solima.

PUFER TTBS, 1 L (0,1% (v/v) Tween 20® u 1 × TBS-u)	
Tween 20® (Sigma, SAD)	1 mL
1 × TBS	do 1 L
PUFER TTBS SA SOLIMA, 1 L (TTBS; 1 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂)	
1 mM CaCl ₂ (Kemika, Hrvatska)	1 mL
1 mM MgCl ₂ (Kemika, Hrvatska)	1 mL
TTBS	do 1 L

3.10 Otkrivanje N-glikoziliranih proteina na membrani lektinom konkavalin A

Prije tretmana lektinima membrane sam isprala u puferu TBS 2×10 minuta, a potom 10 minuta u puferu TTBS sa solima.

Membranu sam prvo inkubirala 90 minuta u otopini lektina konkavalin A (ConA, 25 $\mu\text{L/mL}$), nakon čega sam ju ispirala puferom TTBS sa solima 4×15 minuta. Potom sam membranu inkubirala 60 minuta u otopini peroksidaze (TTBS sa solima s 50 $\mu\text{g/L}$ peroksidaze) te ju isprala 4×15 minuta puferom TTBS sa solima. Na kraju sam ju isprala u puferu TBS u trajanju od 15 minuta, nakon čega je bila spremna za razvijanje.

Za razvijanje sam pripremila otopine A i B (Tablica 14), te ih pomiješala neposredno prije uporabe. Čim su se na membranama pojavile proteinske vrpce razvijanje sam zaustavila ispiranjem u većoj količini reH₂O.

Nakon bojanja, membranu sam osušila pod teretom, između 2 lista Whatman papira, te ju potom skenirala pri rezoluciji od 300 dpi (model skenera HP Scanjet 2400; HP, SAD).

Tablica 14. Sastavi otopina za razvijanje A i B.

OTOPINA A	
TBS	50 mL
30% H ₂ O ₂	30 μL
OTOPINA B	
metanol	10 mL
3,3'-diaminobenzidin, DAB (Sigma, SAD)	30 mg

3.11 Otkrivanje N-glikoziliranih proteina na membrani lektinom GNA

Membranu sam inkubirala 60 minuta u 10 mL otopine TTBS-a sa solima uz dodatak 10 μL lektina GNA obilježenog dioksigeninom (DIG-GNA, Roche, Njemačka), te je potom 3×10 minuta ispirala u TBS puferu.

Kako bih vizualizirala glikoproteinske vrpce, membranu sam nakon toga 60 minuta inkubirala u otopini koja sadrži antiDIG-alkalnu fosfatazu (anti-dioksigenin protutijela za

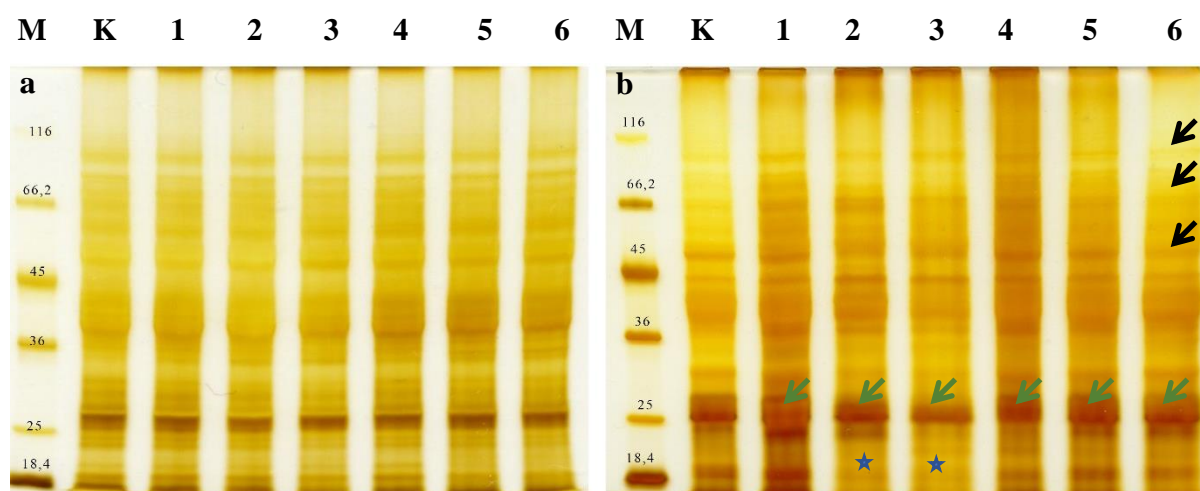
koje je vezana alkalna fosfataza; 10 μ L u 10 mL pufera TBS), nakon čega sam ju isprala 3 \times 10 minuta u TBS puferu. Potom sam u tami, do pojave vrpce, uronila membranu u otopinu pufera TTBS sa solima uz dodatak 15 μ L supstrata BCIP/NBT (eng. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium* (Roche, Njemačka)). Bojenje sam zaustavila potapanjem membrane u veću količinu reH₂O. Potom sam membranu osušila pod teretom, a između 2 lista Whatman papira te ju skenirala pri 300 dpi.

4 REZULTATI

4.1 Ekspresija ukupnih topivih proteina u tkivu kaktusa nakon izlaganja solnom i osmotskom stresu

Ukupne topive stanične proteine detektirala sam na dva načina - reakcijom sa srebrovim nitratom i pomoću boje *Coomassie Brilliant Blue* G-250. Standardno bojenje bojom CBB može detektirati proteine u subpikomolarnim količinama, dok bojenje srebrom tu preciznost nadmašuje za nekoliko redova veličine, ali je osjetljivije na onečišćenje.

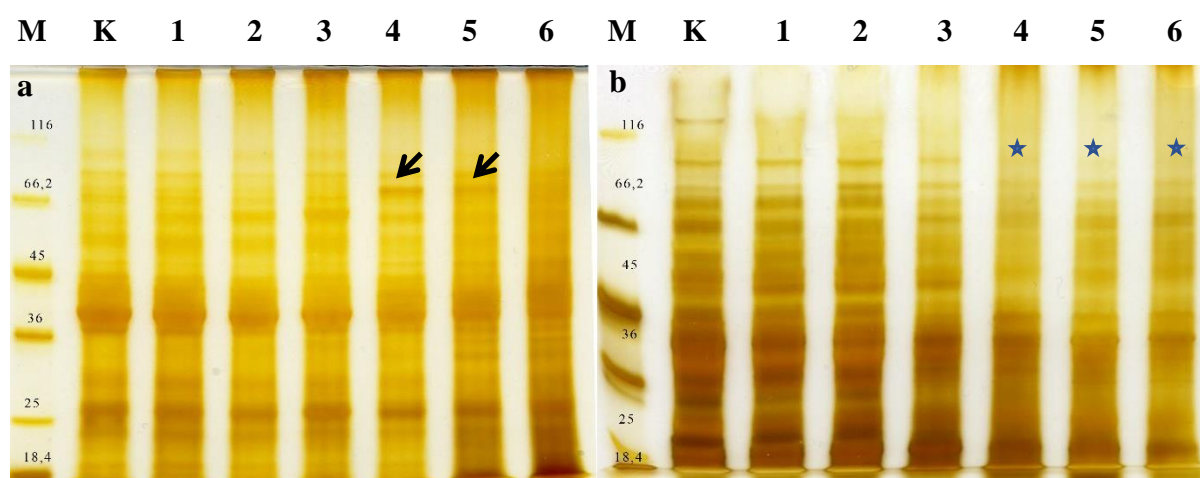
Na Slikama 8. i 9. prikazani su gelovi na kojima su proteini izolirani iz kalusa i tumora razdvojeni nakon tretmana sa soli i manitolom i obojeni srebrovim nitratom. Može se zamijetiti kako tumorsko tkivo, pri istom trajanju utjecaja stresa, generalno ima jače izraženu ekspresiju proteina od kalusa, ali i da pri dužem trajanju stresa, na kalusno tkivo jači utjecaj ima manitol, a na tumorsko sol. Tumorsko tkivo uzgajano na podlozi sa 700 mM manitolom 7 dana pokazalo je ekspresiju proteina od 53, 69 i 77 kDa, koji u kalusnom tkivu nisu detektirani (Slika 8b, crne strelice). Nadalje, proteini od 25-27 kDa (zelene strelice) pokazali su jaču ekspresiju u tumoru u usporedbi s kalusom nakon izlaganja i soli i manitolu (Slika 8a i b). U tumorskom tkivu uočljiv je nedostatak vrpce od oko 18 kDa na tretmanim sa 250 i 350 mM NaCl (Slika 8b, plave zvjezdice). Nakon 14 dana tretmana u kalusnom tkivu izloženom većim koncentracijama manitola uočljiva je pojačana ekspresija vrpce od 66 kDa (Slika 9a, crne strelice), dok je u tumorskom tkivu zapažen nedostatak proteina od oko 70 kDa (Slika 9b, plave zvjezdice) u tkivu izloženome djelovanju manitola u odnosu na kontrolu i tretman s NaCl.



Slika 8. Ukupni topivi proteini u kalusnom (a) i tumorskom (b) tkivu kaktusa nakon 7 dana tretmana natrijevim kloridom i manitolom, obojeni srebrovim nitratom.

Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

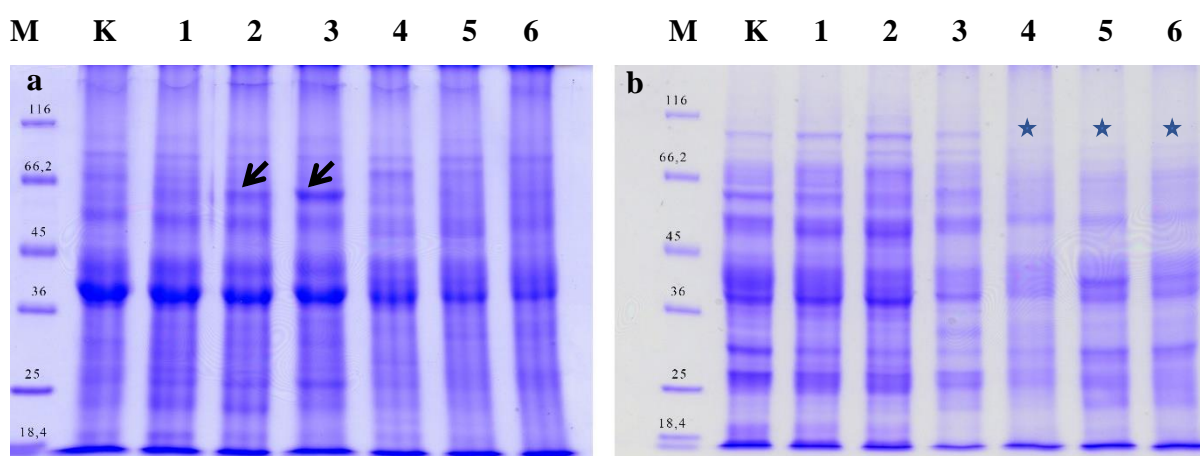
M – biljezi molekulskih masa. Uzorci: K – kontrola; 1 – 150 mM NaCl; 2 – 250 mM NaCl; 3 – 350 mM NaCl; 4 – 300 mM manitol; 5 – 500 mM manitol; 6 – 700 mM manitol.



Slika 9. Ukupni topivi proteini u kalusnom (a) i tumorskom (b) tkivu kaktusa nakon 14 dana tretmana natrijevim kloridom i manitolom, obojeni srebrom. Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

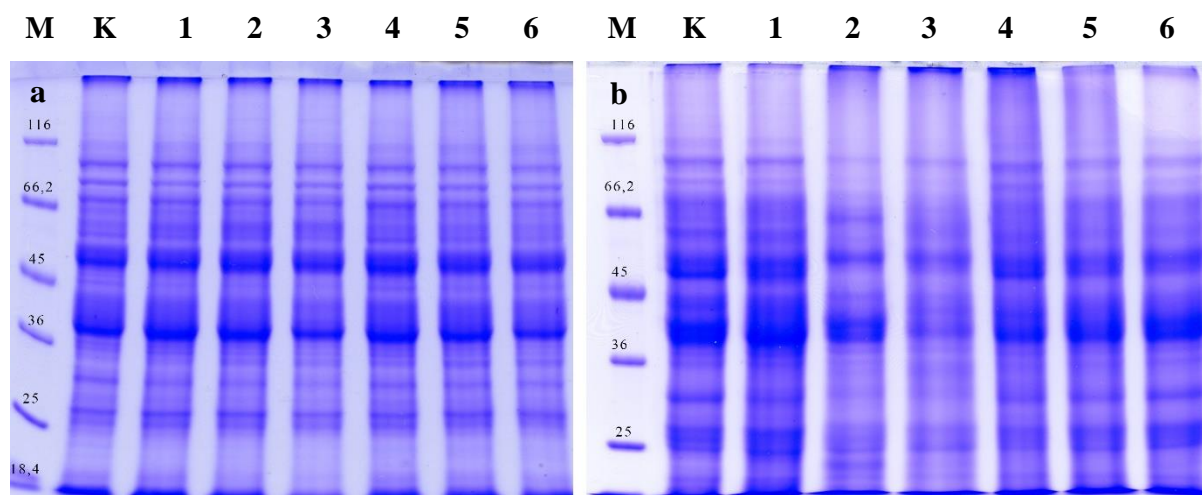
M – biljezi molekulskih masa. Uzorci: K – kontrola; 1 – 150 mM NaCl; 2 – 250 mM NaCl; 3 – 350 mM NaCl; 4 – 300 mM manitol; 5 – 500 mM manitol; 6 – 700 mM manitol.

Na Slikama 10. i 11. prikazani su gelovi na kojima su proteini izolirani iz kalusa i tumora razdvojeni nakon tretmana sa soli i manitolom i obojani bojom CBB. Nakon tretmana od 7 dana, u kalusnom tkivu uočena je pojačana ekspresija proteina od oko 60 kDa nakon izlaganja 250 i 350 mM NaCl (Slika 10a, crne strelice), dok je u tumorskom tkivu uočena slabija ekspresija proteina na najvećoj koncentraciji NaCl te u svim tretmanima s manitolom; osobito je uočljiv nedostatak vrpce od oko 70 kDa u tretmanim s manitolom (Slika 10b, plave zvjezdice). Nakon 14 dana tretmana, u kalusu nije primijećena razlika u ekspresiji proteina između tretiranih uzoraka i kontrole (Slika 11a), a u tumoru su uzorci tretirani sa 250 i 350 mM NaCl rezultirali slabijom ekspresijom svih proteina u odnosu na kontrolu i druge tretmane (Slika 11b).



Slika 10. Ukupni topivi stanični proteini u kalusnom (a) i tumorskom (b) tkivu kaktusa nakon 7 dana tretmana natrijevim kloridom i manitolom. Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

M – biljezi molekulskih masa. Uzorci: K – kontrola; 1 – 150 mM NaCl; 2 – 250 mM NaCl; 3 – 350 mM NaCl; 4 – 300 mM manitol; 5 – 500 mM manitol; 6 – 700 mM manitol.



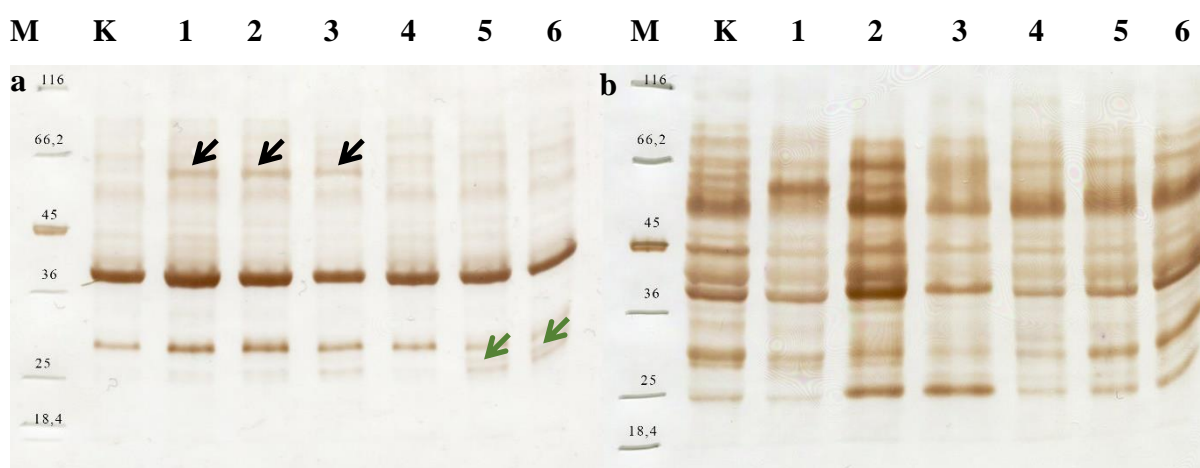
Slika 11. Ukupni topivi stanični proteini u kalusnom (a) i tumorskom (b) tkivu kaktusa nakon 14 dana tretmana natrijevim kloridom i manitolom.

M – biljezi molekulskih masa. Uzorci: K – kontrola; 1 – 150 mM NaCl; 2 – 250 mM NaCl; 3 – 350 mM NaCl; 4 – 300 mM manitol; 5 – 500 mM manitol; 6 – 700 mM manitol.

4.2 Glikoproteinski obrasci ukupnih topivih proteina u tkivu kaktusa nakon izlaganja solnom i osmotskom stresu

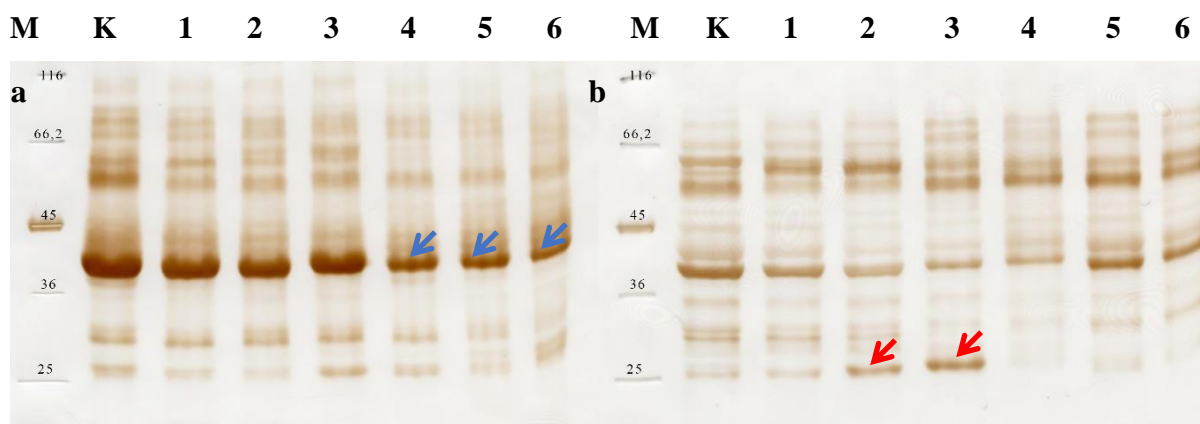
4.2.1 N-glikozilirani proteini detektirani lektinom konkavalin A

Na Slikama 12 i 13. prikazani su N-glikozilirani proteini kalusnog i tumorskog tkiva kaktusa *M. gracilis*, otkriveni lektinom konkavalin A (Con A), koji se sa visokim afinitetom i specifičnošću veže za sastavni dio središnje strukture svih N-glikana, te je stoga njime moguće otkriti sve N-glikozilirane proteine u proteinskom ekstraktu.



Slika 12. Proteini u kalusnom (a) i tumorskom (b) tkivu kaktusa nakon 7 dana tretmana natrijevim kloridom i manitolom, obilježeni lektinom konkavalin A. Strelice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

M – biljezi molekulskih masa. Uzorci: K – kontrola; 1- 150 mM NaCl-; 2 – 250 mM NaCl; 3 – 350 mM NaCl; 4 – 300 mM manitol; 5 – 500 mM manitol; 6 – 700 mM manitol.



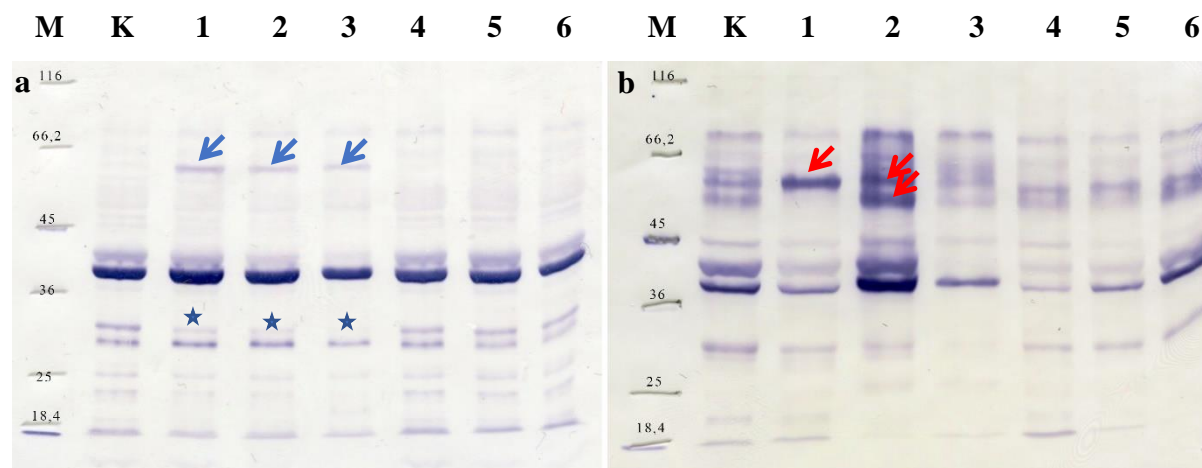
Slika 13. Proteini u kalusnom (a) i tumorskom (b) tkivu kaktusa nakon 14 dana tretmana natrijevim kloridom i manitolom, obilježeni lektinom konkavalin A. Strelice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje je opisano je u tekstu.

M – biljezi molekulskih masa. Uzorci: K – kontrola; 1 – 150 mM NaCl-; 2 – 250 mM NaCl; 3 – 350 mM NaCl; 4 – 300 mM manitol; 5 – 500 mM manitol; 6 – 700 mM manitol.

Po završetku tretmana od 7 dana, unutar uzoraka proteina kalusnog tkiva može se primijetiti pojačana glikozilacija proteina od oko 60 kDa u tkivu tretiranom sa NaCl (Slika 12a, crne strelice) u usporedbi s kontrolom i tretmanom s manitolom. Također je uočljiva pojava vrpca od oko 30 kDa (Slika 12a, zelene strelice) u kalusnom tkivu nakon izlaganja većim koncentracijama manitola. Za tumorsko tkivo je značajna ukupno pojačana glikozilacija nakon tretmana s 250 mM NaCl-om (Slika 12b). U uzorcima tretiranim 14 dana, u kalusnom tkivu izloženom manitolu zamjećuje se slabije eksprimirana vrpca od 40 kDa (Slika 13a, plave strelice) u usporedbi s kontrolom i tretmanima sa soli. Za tumorsko tkivo je karakteristična pojačana glikozilacija proteina od oko 25 kDa (Slika 13b, crvene strelice) u tkivu izloženom 250 i 350 mM NaCl.

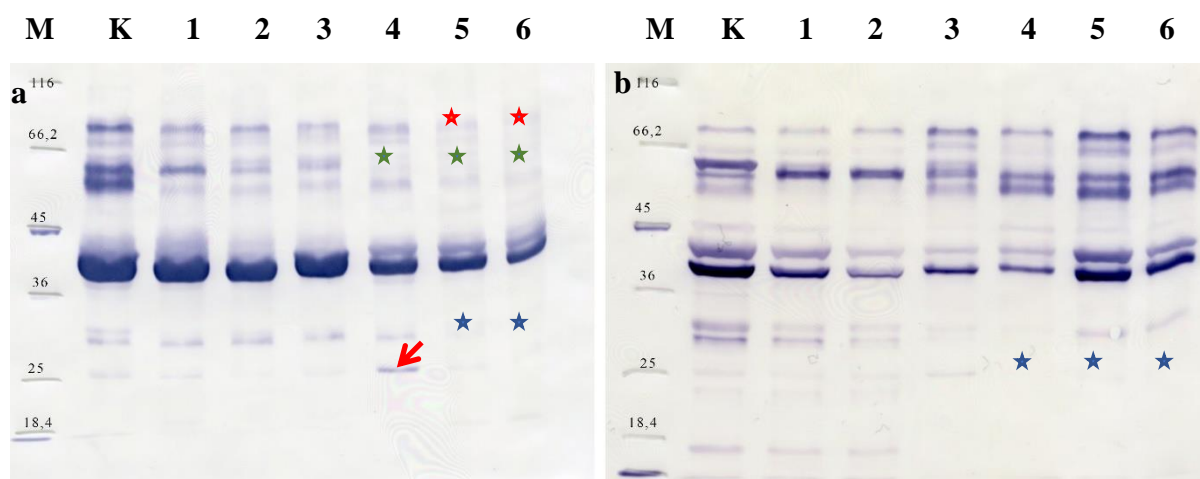
4.2.2 Proteini vezani na visoko-manozni tip N-glikana detektirani lektinom GNA

Na Slikama 14. i 15. prikazani su N-glikozilirani proteini visoko-manoznog tipa, u kalusnom i tumorskom tkivu kaktusa *M. gracilis*, otkriveni lektinom GNA.



Slika 14. N - glikani visoko-manoznog tipa vezani za topive stanične proteine u kalusnom (a) i tumorskom (b) tkivu kaktusa nakon 7 dana tretmana natrijevim kloridom i manitolom, obilježeni lektinom GNA. Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

M – biljezi molekulskih masa. Uzorci: K – kontrola; 1 – 150 mM NaCl-; 2 – 250 mM NaCl; 3 – 350 mM NaCl; 4 – 300 mM manitol; 5 – 500 mM manitol; 6 – 700 mM manitol.



Slika 15. N - glikani visoko-manoznog tipa vezani za topive stanične proteine u kalusnom (a) i tumorskom (b) tkivu kaktusa nakon 14 dana tretmana natrijevim kloridom i manitolom, obilježeni lektinom GNA. Strelice i zvjezdice na slici označavaju primijećene razlike u ekspresiji proteina između različitih uzoraka, a detaljno objašnjenje opisano je u tekstu.

M - biljezi molekulskih masa. Uzorci: Uzorci: K - kontrola; 1- 150 mM NaCl-; 2 – 250 mM NaCl; 3 – 350 mM NaCl; 4 – 300 mM manitol; 5 – 500 mM manitol; 6 – 700 mM manitol.

U kalusnom tkivu izloženom tretmanima 7 dana uočljiva je pojačana glikozilacija proteina od 60 kDa (Slika 14a, plave strelice) nakon izlaganja svim koncentracijama NaCl, a istovremeno je zabilježena slabija ekspresija glikoproteina od 30 kDa (Slika 14a, plave zvjezdice) u istim tretmanima. U tumorskom tkivu pojačanu glikozilaciju pokazao je protein od 60 kDa u tretmanima sa 150 i 250 mM NaCl te protein od 58 kDa u tretmanu s 250 mM NaCl (Slika 14b, crvene strelice). Nakon 14 dana tretmana zabilježena je pojačana glikozilacija proteina od 25 kDa (Slika 15a, crvena strelica) u kalusnom tkivu izloženom 300 mM manitolu, dok su glikoproteini od 30 kDa (Slika 15a, plave zvjezdice) bili slabije ekspimirani nakon izlaganja 500 i 700 mM manitolu. Također je zabilježena i slabija glikozilacija proteina od 66 kDa (Slika 15a, crvene zvjezdice) i 60 kDa (Slika 15a, zelene zvjezdice) u tretmanima s manitolom. U tumorskom tkivu uočljiv je nedostatak vrpce od 25 kDa (Slika 15b, plava zvjezdica) u svim tretmanima s manitolom.

Modelna biljka korištena u ovom istraživanju za proučavanje solnog, odnosno osmotskog stresa, je kaktus *Mammillaria gracilis*, vrsta iz porodice Cactaceae. Iako *M. gracilis* nije komercijalno zanimljiva biljna vrsta u Europi, njene prilagodbe na sušna tla čine je pogodnim organizmom za proučavanje biokemijskih i molekularnih mehanizama tijekom izlaganja solnom i osmotskom stresu (Balen 2002). Nadalje, vrste iz ove porodice vrlo su osjetljive na uvjete u kulturi tkiva i, kao rezultat toga, razvijaju habituirane (neosjetljive na dodatak hormona) i hiperhidrirane kaluse koji se mogu uspoređivati sa tumorskim stanicama jer, kao i tumori, zadržavaju meristemske osobine. Navedena svojstva čine ih dobrim sustavom za proučavanje diferencijacije stanica i utjecaja stresa na njihov stanični mehanizam (Balen 2002).

Budući da se radi o sesilnim organizmima, biljke se oslanjaju na adaptivnost proteoma prilikom promjene ekoloških (i drugih) uvjeta, što uključuje promjene tijekom razvoja, uslijed varijabilnih okolišnih uvjeta i tijekom obrane biljke od biotičkog i abiotičkog stresa (Kamal i sur. 2010). Proteini su makromolekule izravno odgovorne za odvijanje većine bioloških procesa u stanicama, a na promjene u proteinskoj slici, što uključuje promjene u sintezi i funkciji proteina, mogu utjecati različiti biotički i abiotički čimbenici. Dakle, abiotički stres rezultira adaptivnim promjenama u biljnom proteomu, uključujući promjene u relativnoj zastupljenosti, odnosno ekspresiji proteina, te njihovim posttranslacijskim modifikacijama i, posljedično, samim biološkim funkcijama proteina. Iako su proteini direktni proizvodi gena, oni odražavaju ekspresiju gena specifično i s obzirom na različita tkiva, tako da promjene u proteinskoj slici direktno pokazuju razlike u aktivnosti gena (Balen 2002), koje, između ostalog, mogu biti rezultat različite sposobnosti prilagodbe tkiva na stresne faktore, kao i varijacija u količini stresnih faktora koji u danom trenutku djeluju na biljku, stoga se može reći kako je promjena ekspresije proteina rezultat i okolišnih čimbenika i razvojnog stanja biljke. Sposobnost biljke da preživi u stresnom okruženju ovisi o različitim mehanizmima prilagodbe na stres kojima upravlja mali broj gena, vjerojatno uz doprinos većeg broja modifikacija (Schat i sur. 2000). Narušavanjem normalne ravnoteže biljnog organizma zbog vanjskih utjecaja dolazi do niza promjena koje se mogu pratiti na razini tkiva ili stanice, a određivanje ukupne koncentracije staničnih proteina predstavlja rani pokazatelj takvih utjecaja. Neka su istraživanja pokazala da abiotički stres može promijeniti ukupnu količinu proteina u biljci (Rostami i Ehsanpour 2009, Doganlar i Atmaca 2011), što je u skladu sa promjenama u ekspresiji proteina koje su dobivene u ovom istraživanju.

Naime, analizom diferencijalne ekspresije proteina otkrivene primjenom tehnike SDS-PAGE, vidljivo je kako tkiva kalusa i tumora na isti stres reagiraju različitom ekspresijom proteina, primjerice, u tumorskom tkivu tretiranom manitolom detektirano je više proteinskih vrpca koje se u kalusu nisu pojavile. Reakcija na solni i osmotski stres može se očitovati na dva načina: pojačanom ekspresijom proteina koji sudjeluju u samom odgovoru na stres ili aktiviranjem metaboličkih puteva koji bi eliminirali štetne produkte koji nastaju radi stresa (Kalifa i sur. 2004b). U svom radu Balen i sur. (2013) pokazali su da solni i osmotski stres itekako utječu na metabolizam biljaka kroz nekoliko različitih mehanizama (promjene u fosforilacijskom statusu proteina, aktivacija antioksidacijskih proteina, itd.), stoga sam ovim istraživanjem htjela provjeriti kako tkiva kalusa i tumora reagiraju na izlaganje soli i manitolu pomoću detaljnog proučavanja promjena u glikozilaciji proteina, važnoj posttranslacijskoj modifikaciji.

Posttranslacijske modifikacije ključan su mehanizam trenutnog moduliranja biološke funkcije nekog proteina, a određena funkcija dodatkom posttranslacijske modifikacije može biti aktivirana ili utišana. Za detekciju glikoproteina kaktusa u ovom istraživanju korištena su dva lektina, Con A, koji detektira sve N-glikozilirane proteine te GNA, koji se specifično veže na terminalne ostatke manoze. Neki od glikoproteina koji su detektirani lektinom ConA, također su uočeni i nakon obrade membrana lektinom GNA, koji prepoznaje terminalne grupe α -D-manoze, osobito one povezane vezom Man- α (1-3)-Man. Ovaj rezultat navodi na zaključak su proteini detektirani s obje vrste lektina glikoproteini koje na svojim specifičnim asparaginskim ostacima imaju vezane N-glikane visokomanoznog i/ili hibridnog tipa (Balen i sur. 2007). Nadalje, tumorsko tkivo karakterizira pojačana N-glikozilacija proteina u odnosu na kalus, što je u skladu i sa rezultatima prijašnjih istraživanja u kojima je zapažena jača glikozilacija proteina u transformiranom u usporedbi sa kalusnim tkivom (Balen i sur. 2007, Krsnik-Rasol i sur. 2000). Ako se usporede kontrolna tkiva kalusa i tumora s odgovarajućim tkivima izloženim solnom i osmotskom stresu, može se uočiti kako i NaCl i manitol izazivaju promjene u N-glikozilaciji staničnih proteina. Promjene u glikozilaciji proteina objavili su i drugi autori nakon izlaganja biljnog tkiva abiotičkom stresu. Peharec Štefanić i sur. (2012) primijetili su pojačanu glikozilaciju proteina duhana nakon izlaganja biljaka kadmiju i cinku, dok su Komatsu i sur. (2009) uočili promjenu u glikozilaciji proteina iz riže, detektiranu lektinom Con A, nakon stresa izazvanog hladnoćom. Što se tiče analiza u profilu glikozilacije biljnih proteina nakon solnog i

osmotskog stresa, istraživanja su pokazala da N-glikozilacija proteina ima važnu ulogu u odgovoru biljke na navedene stresne uvjete (Kang i sur. 2008, Koiwa i sur. 2003), što je u skladu sa rezultatima dobivenim u ovom diplomskom radu. Analizom N-glikoziliranih proteina detektiranih vezanjem sa lektinima Con A i GNA vidljivo je da dodatak soli i manitola potiče ili smanjuje glikozilaciju proteina u oba istraživana tkiva. Također, budući da se obrazac glikozilacije između uzoraka istog tipa tkiva razlikovao, kako sa dužinom izloženosti stresu ili porastom koncentracije stresnog čimbenika u podlozi, može se zaključiti kako sol i manitol kao faktori solnog i osmotskog abiotičkog stresa utječu na N-glikozilaciju ukupnih staničnih proteina, odnosno da je N-glikozilacija mehanizam reakcije na abiotički stres. Analiza proteina izoliranih iz kalusa i tumora nakon tretmana sa soli i manitolom pokazala je kako tumorsko tkivo, pri istom trajanju utjecaja stresa, generalno ima jače izraženu ekspresiju proteina od kalusa. Mogući razlog za to je niža razina tkivne organizacije u tumorskom tkivu nego u kalusu. Istovremeno, pri duljem trajanju stresa, manitol ima jači utjecaj na kalusno tkivo, a na tumorsko sol, mogući razlog čemu je slabija mogućnost tumorskog tkiva da se nosi sa toksičnim ionima.

6 ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata istraživanja moguće je izvesti slijedeće zaključke:

1. Dodatak natrijevog klorida i manitola u hranidbenu podlogu uzrokuje pojačanu ekspresiju proteina, kako u kalusnom, tako i u tumorskom tkivu vrste *M. gracilis* Pfeiff.
2. Dodatak natrijevog klorida i manitola u hranidbenu podlogu uzrokuje promjene u obrascu N-glikozilacije proteina u obje vrste tkiva.
3. Tumorsko tkivo, pri istom trajanju utjecaja stresa, generalno ima jače izraženu ekspresiju proteina od kalusa; istovremeno, pri duljem trajanju stresa, manitol ima jači utjecaj na kalusno tkivo, a na tumorsko sol.
4. Budući da postoji razlika u ekspresiji između glikoproteina kalusnog i tumorskog tkiva pod istom količinom i vremenskim trajanjem abiotičkog stresa, postoji tkivna specifičnost proteinske N-glikozilacije.
5. Budući da postoji razlika u ekspresiji glikoproteina unutar istog tipa tkiva, a različite vrste stresora u podlozi, stupanj glikozilacije ovisi o vrsti stresa kojoj je tkivo izloženo.

7 LITERATURA

- Alberts, B., Wilson, J. & Hunt, T. (2008). Molecular biology of the cell. *Garland Science, New York*.
- Andersen, D. C. & Goochee, C. F. (1994). The effect of cell-culture conditions on the oligosaccharide structures of secreted glycoproteins. *Current opinion in biotechnology*, 5(5), str. 546-549.
- Arora, A., Sairam, R.K. & Srivastava, G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current science*, str. 1227-1238.
- Aubourg, S. & Rouzé, P. (2001). Genome annotation. *Plant physiology and biochemistry*, 39(3-4), str. 181-193.
- Balen, B., Milošević, J. & Krsnik-Rasol, M. (2002). Protein and glycoprotein patterns related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. *Food technology and biotechnology*, 40(4), str. 275-280.
- Balen, B., Krsnik-Rasol, M. & Simeon-Rudolf, V. (2003). Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* Pfeiff. tissue culture. *Journal of plant physiology*, 160(11), str. 1401-1406.
- Balen, B., Krsnik-Rasol, M., Zamfir, A., Zadro, I., Vakhrushev S. & Peter-Katalinić, J. (2007). Assessment of N-glycan heterogeneity of cactus glycoproteins by one dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser/desorption time-of-flight mass spectrometry. *Journal of biomolecular techniques* 18(3), str. 162-172.
- Balen, B., Tkalec, M., Pavoković, D., Pevalak-Kozlina, B. & Krsnik-Rasol, M. (2009). Growth conditions in *in vitro* culture can induce oxidative stress in *Mammillaria gracilis* tissues. *Journal of plant growth regulation*, 28(1), str. 36-45.
- Balen, B., Pavoković, D., Peharec Štefanić, P. & Krsnik-Rasol, M. (2011). Elektroforetske tehnike istraživanja proteina. Sveučilišni priručnik, *Hrvatska sveučilišna naklada*, str. 57.
- Balen, B., Tkalec, M., Rogić, T., Šimac, M., Štefanić, P.P., Rončević, S., Svedružić, L.P. & Krsnik-Rasol, M. (2013). Effects of iso-osmotic NaCl and mannitol on growth, proline content, and antioxidant defense in *Mammillaria gracilis* Pfeiff. *in vitro*-grown cultures. *In vitro cellular & developmental biology-plant*, 49(4), str.421-432.
- Balen, B. (2016). Promjene u ekspresiji biljnih proteina izazvane nanočesticama srebra. *Educatio biologiae* 2 (2016), str. 115-130.
- Beck, E. H., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K. & Bhattarai, T. (2007). Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of biosciences*, 32(3), str. 501-510.
- Bitá, C. E. & Greates, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in plant science*, 4, str. 273.
- Blum, H., Beier, H. & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), str. 93-99.

- Bohnert, H.J., Ayoubi, P., Borchert, C., Bressan, R.A., Burnap, R.L., Cushman, J.C., Cushman, M.A., Deyholos, M., Fischer, R., Galbraith, D.W. & Hasegawa, P.M. (2001). A genomics approach towards salt stress tolerance. *Plant physiology and biochemistry*, 39(3-4), str. 295-311.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in plant science*, 2(2), str. 48-54.
- Cassells, A. C. & Curry, R. F. (2001). Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant cell, tissue and organ culture*, 64(2-3), str. 145-157.
- Clemens, S. (2006). Toxic metal accumulation, responses to exposure and mechanisms of tolerance in plants. *Biochimie* 88(11), str. 1707-1719.
- Cummings, R. D., Darvill, A. G., Etzler, M. E. & Hahn, M. G. (2017). Glycan-recognizing probes as tools. U: Hart, Marth, Cummings, Varki (ur.): *Essentials of glycobiology. 3rd edition [Internet], Cold Spring Harbor Laboratory Press.*
- Cvjetko, P., Zovko, M. & Balen, B. (2014). Proteomics of heavy metal toxicity in plants. *Archives of industrial hygiene and toxicology*, 65(1), str. 1–18.
- Das P., Kamlesh K.N., Sneha L.S.P. & Pareek A. (2015). Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. *Frontiers in environmental science*, 2(70), str. 1-11.
- Doganlar Z.B., Atmaca M. (2011). Influence of airborne pollution on Cd, Zn, Pb, Cu, and Al accumulation and physiological parameters of plant leaves in Antakya (Turkey). *Water, air, and soil pollution* 214(1-4), str. 509-523.
- Duressa, D., Soliman, K., Taylor, R. & Senwo, Z. (2011). Proteomic analysis of soybean roots under aluminum stress. *International journal of plant genomics*, 2011.
- Eigenbrod, F., Gonzalez, P., Dash, J. & Steyl, I. (2015). Vulnerability of ecosystems to climate change moderated by habitat intactness. *Global change biology*, 21(1), str. 275-286.
- Elbers, I.J., Stoopen, G.M., Bakker, H., Stevens, L.H., Bardor, M., Molthoff, J.W., Jordi, W.J., Bosch, D. & Lommen, A. (2001). Influence of growth conditions and developmental stage on N-glycan heterogeneity of transgenic immunoglobulin G and endogenous proteins in tobacco leaves. *Plant physiology*, 126(3), str. 1314-1322.
- Elias-Rocha, M., Santos-Diaz, M. & Arredondo-Gómez, A. (1998). Propagation of *Mammillaria candida* (Cactaceae) by tissue culture techniques. *Haseltonia* (6), str. 96-101.
- Erdei, L., Trivedi, S., Takeda, K. & Matsumoto, H. (1990). Effects of osmotic and salt stresses on the accumulation of polyamines in leaf segments from wheat varieties differing in salt and drought tolerance. *Journal of plant physiology*, 137(2), str. 165-168.
- Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H. (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free radical biology and medicine*, 11(1), str. 81–128.

- Frank, J., Kaulfurst-Soboll, H., Rips, S., Koiwa, H. & von Schaewen, A. (2008). Comparative analyses of Arabidopsis complex glycan1 mutants and genetic interaction with staurosporin and temperature sensitive 3a. *Plant physiology*, 148(3), str. 1354-1367.
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.-F. & Dommes, J. (2002). Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant growth regulation*, 37(3), str. 263-285.
- Greenway, H. & Munns, R. (1980). Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annual review of plant physiology*, 31(1), str. 149-190.
- Gribble, K. (1999). The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. *Plant growth regulation*, 27(3), str. 181-190.
- Gucci, R., Aronne, G., Lombardini, L. & Tattini, M. (1997). Salinity tolerance in *Phillyrea* species. *The new phytologist*, 135(2), str. 227-234.
- Hao, X. Y., Han, X., Ju, H. & Lin, E. D. (2010). Impact of climatic change on soybean production: a review. *Ying yong sheng tai xue bao*, 21(10), str. 2697-2706.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (1989). Free radicals in biology and medicine. chapter 3, str. 77-151.; 2nd edition, Clarendon Press, Oxford
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K. & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 51(1), str. 463-499.
- Hirano, H., Islam, N. & Kawasaki, H. (2004). Technical aspects of functional proteomics in plants. *Phytochemistry*, 65(11), str. 1487-1498.
- Hirayama, T. & Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *The plant journal*, 61(6), str. 1041-1052.
- Ingram, J. & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), str. 377-403.
- Jones, H.G. & M.B. Jones (1989). Some terminology and common mechanisms. U: Jones, H. G. i sur. (ur.). Plants Under Stress. Cambridge University Press
- Kaji H., Saito H., Yamauchi Y., Shinkawa T., Taoka M. & Hirabayashi J. (2003). Lectin affinity capture, isotope-coded tagging and mass spectrometry to identify N-linked glycoproteins. *Nature biotechnology* 21(6), str. 667-672.
- Kalifa, Y., Perlson, E., Gilad, A., Konrad, Z., Scolnik, P. A. & Bar-Zvi, D. (2004a). Over-expression of the water and salt stress-regulated Asr1 gene confers an increased salt tolerance. *Plant, cell & environment*, 27(12), str. 1459-1468.
- Kalifa, Y., Gilad, A., Konrad, Z., Zaccari, M., Scolnik, P. A. & Bar-Zvi, D. (2004b). The water- and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochemical journal*, 381, str. 373-378.

- Kamal, A.H.M., Kim, K.H., Shin, K.H., Choi, J.S., Baik, B.K., Tsujimoto, H., Heo, H.Y., Park, C.S. & Woo, S.H. (2010). Abiotic stress responsive proteins of wheat grain determined using proteomics technique. *Australian journal of crop science*, 4(3), str. 196.
- Kang, J.S., Frank, J., Kang, C.H., Kajiura, H., Vikram, M., Ueda, A., Kim, S., Bahk, J.D., Triplett, B., Fujiyama, K. & Lee, S.Y. (2008). Salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* requires maturation of N-glycosylated proteins in the Golgi apparatus. *Proceedings of the national academy of sciences*, 105(15), str. 5933-5938.
- Kang, B.S., Baek, J.H., Macoy, D.M., Chakraborty, R., Cha, J.Y., Hwang, D.J., Lee, Y.H., Lee, S.Y., Kim, W.Y. & Kim, M.G. (2015). N-glycosylation process in both ER and Golgi plays pivotal role in plant immunity. *Journal of plant biology*, 58(6), str. 374-382.
- Kelleher, D. J. & Gilmore, R. (2006). An evolving view of the eukaryotic oligosaccharyltransferase. *Glycobiology*, 16(4), str. 47R-62R
- Kerepesi, I. & Galiba, G. (2000). Osmotic and salt stress-induced alteration in soluble carbohydrate content in wheat seedlings. *Crop science*, 40(2), str. 482-487.
- Kissoudis, C., van de Wiel, C., Visser, R. G. & van der Linden, G. (2014). Enhancing crop resilience to combined abiotic and biotic stress through the dissection of physiological and molecular crosstalk. *Frontiers in plant science*, 5, str. 207.
- Koiwa, H., Li, F., McCully, M.G., Mendoza, I., Koizumi, N., Manabe, Y., Nakagawa, Y., Zhu, J., Rus, A., Pardo, J.M. & Bressan, R.A. (2003). The STT3a subunit isoform of the *Arabidopsis* oligosaccharyltransferase controls adaptive responses to salt/osmotic stress. *The plant cell*, 15(10), str. 2273-2284.
- Komatsu, S., Yamada, E. & Furukawa, K. (2009). Cold stress changes the concanavalin A-positive glycosylation pattern of proteins expressed in the basal parts of rice leaf sheaths. *Amino acids*, 36(1), str. 115-123.
- Kornfeld, R. & Kornfeld, S. (1985). Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual review of biochemistry*, 54(1), str. 631-664.
- Kosová, K., Vítámvás, P., Urban, M. O., Prášil, I. T. & Renaut, J. (2018). Plant abiotic stress proteomics: the major factors determining alterations in cellular proteome. *Frontiers in plant science*, 9, str. 122.
- Krsnik-Rasol, M., Čipčić H., Poljuha, D., Hagège, D. (2000). Electrophoretic protein patterns of sugar beet tissue lines. *Phyton* 41, str. 13–20.
- Krsnik Rasol, M. & Balen, B. (2001). Electrophoretic protein patterns and peroxidase activity related to morphogenesis in *Mammillaria gracillis* tissue culture. *Acta botanica Croatica*, 60(2), str. 219-226.
- Kuster, B., Wheeler, S. F., Hunter, A. P., Dwek, R. A. & Harvey, D. J. (1997). Sequencing of N-linked oligosaccharides directly from protein gels: in-gel deglycosylation followed by matrix-

- assisted laser desorption/ionization mass spectrometry and normal-phase high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 250(1), str. 82-101.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), str. 680.
- Lefevre, I., Gratia, E. & Lutts, S. (2001). Discrimination between the ionic and osmotic components of salt stress in relation to free polyamine level in rice (*Oryza sativa*). *Plant science*, 161(5), str. 943-952.
- Lerouxel, O., Mouille, G., Andème-Onzighi, C., Bruyant, M. P., Séveno, M., Loutelier-Bourhis, C. & Lerouge, P. (2005). Mutants in defective glycosylation, an *Arabidopsis* homolog of an oligosaccharyltransferase complex subunit, show protein underglycosylation and defects in cell differentiation and growth. *The plant journal*, 42(4), str. 455-468.
- Mahajan, S. & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), str. 139-158.
- Malda, G., Backhaus, R. A. & Martin, C. (1999). Alterations in growth and crassulacean acid metabolism (CAM) activity of in vitro cultured cactus. *Plant cell, tissue and organ culture*, 58(1), str. 1-9.
- Manavalan, L. P., Chen, X., Clarke, J., Salmeron, J. & Nguyen, H. T. (2012). RNA-mediated disruption of squalene synthase improves drought tolerance and yield in rice. *Journal of experimental botany*, 63(1), str. 163-175.
- Manavalan, L. P., Guttikonda, S. K., Phan Tran, L.-S. & Nguyen, H. T. (2009). Physiological and molecular approaches to improve drought resistance in soybean. *Plant and cell physiology*, 50(7), str. 1260-1276.
- Mangolin, C. A., Prioli, A. J. & Machado, M. F. (1997). Isozyme variability in plants regenerated from calli of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Biochemical genetics*, 35(5-6), str. 189-204.
- McWilliam, J. (1986). The national and international importance of drought and salinity effects on agricultural production. *Functional plant biology* 13(1), str. 1-13.
- Meena, K.K., Sorty, A.M., Bitla, U.M., Choudhary, K., Gupta, P., Pareek, A., Singh, D.P., Prabha, R., Sahu, P.K., Gupta, V.K. & Singh, H.B. (2017). Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. *Frontiers in plant science*, 8, str. 172.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), str. 405-410.
- Mohorko, E., Glockshuber, R. & Aeby, M. (2011). Oligosaccharyltransferase: the central enzyme of N-linked protein glycosylation. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(4), str. 869-878.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), str. 473-497.

- Murillo-Amador, B., Cortés-Avila, A., Troyo-Diéguez, E., Nieto-Garibay, A. & Jones, H. (2001). Effects of NaCl salinity on growth and production of young cladodes of *Opuntia ficus-indica*. *Journal of agronomy and crop science*, 187(4), str. 269-279.
- Pan, S., Chen, R., Aebersold, R. & Brentnall, T. A. (2011). Mass spectrometry based glycoproteomics-from a proteomics perspective. *Molecular & cellular proteomics*, 10(1), str. R110-003251.
- Parihar, P., Singh, S., Singh, R., Singh, V. P. & Prasad, S. M. (2015). Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. *Environmental science and pollution research*, 22(6), str. 4056-4075.
- Park, O.M.K. (2004). Proteomic studies in plants. *BMB Reports*, 37(1), str. 133-138.
- Parvaiz, A. & Satyawati, S. (2008). Salt stress and phyto-biochemical responses of plants-a review. *Plant soil and environment*, 54(3), str. 89.
- Peharec Štefanić, P., Šikić, S., Cvjetko, P. & Balen, B. (2012). Cadmium and zinc induced similar changes in protein and glycoprotein patterns in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) seedlings and plants. *Archives of industrial hygiene and toxicology*, 63(3), str. 321-335.
- Pevalek-Kozlina, B. & Boban, B. (2003). Fiziologija bilja. *Profil international*.
- Rayon, C., Lerouge, P. & Faye, L. (1998). The protein N-glycosylation in plants. *Journal of experimental botany*, 49(326), str. 1463-1472.
- Reddy, A. R., Chaitanya, K. V. & Vivekanandan, M. (2004). Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *Journal of plant physiology*, 161(11), str. 1189-1202.
- Roth, Z., Yehezkel, G. & Khalaila, I. (2012). Identification and quantification of protein glycosylation. *International journal of carbohydrate chemistry*, vol. 2012, Article ID 640923.
- Rostami F. & Ehsanpour A.A. (2009). Application of silver thiosulfate (STS) on silver accumulation and protein pattern of potato (*Solanum tuberosum* L.) under in vitro culture. *Malaysian applied biology* 38(2), str. 46-54.
- Ruiz-May, E., Kim, S. J., Brandizzi, F. & Rose, J. K. (2012). The secreted plant N-glycoproteome and associated secretory pathways. *Frontiers in plant science*, 3, str. 117.
- Salekdeh, G. H., Siopongco, J., Wade, L. J., Ghareyazie, B. & Bennett, J. (2002). Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2(9), str. 1131-1145.
- Sanità di Toppi, L. & Gabbrielli, R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and experimental botany*, 41(2), str. 105-130.
- Schachter, H. (1991). Enzymes associated with glycosylation. *Current opinion in structural biology*, 1(5), str. 755-765.

- Schat, H., Llugany, M. & Bernhard, R. (2000). Metal-specific pattern of tolerance, uptake, and transport of heavy metals in hyperaccumulating and non-hyperaccumulating metallophytes. *Phytoremediation of contaminated soils and water*, str. 171-188.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current opinion in plant biology*, 3(3), str. 217-223.
- Sies, H. (1985). Oxidative stress. U: Sies, H. (ur.). Oxidative stress. *Academic Press*, str. 1-7.
- Silva-Ortega, C. O., Ochoa-Alfaro, A. E., Reyes-Agüero, J. A., Aguado-Santacruz, G. A. & Jiménez-Bremont, J. F. (2008). Salt stress increases the expression of p5cs gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant physiology and biochemistry*, 46(1), str. 82-92.
- Strasser, R. (2014). Biological significance of complex N-glycans in plants and their impact on plant physiology. *Frontiers in plant science*, 5, str. 363.
- Sturm, A., Van Kuik, J. A., Vliegenthart, J. F. & Chrispeels, M. J. (1987). Structure, position, and biosynthesis of the high mannose and the complex oligosaccharide side chains of the bean storage protein phaseolin. *Journal of biological chemistry*, 262(28), str. 13392-13403.
- Štefan, L., Tepšić, T., Zavidčić, T., Urukalo, M., Tota, D. & Domitrović, R. (2007). Lipidna peroksidacija - uzroci i posljedice. *Medicina fluminensis*, 43(2.), str. 84-93.
- Székely, G. (2009). Oxidative stress in plants. *Studia Universitatis Babes-Bolyai, Biologia*, 2009 Jul 1(2)
- Varki, A. (1993). Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology*, 3(2), str. 97-130.
- Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Marth, J.D., Bertozzi, C.R., Hart, G.W. & Etzler, M.E. (2009). Symbol nomenclature for glycan representation. *Proteomics*, 9(24), str. 5398-5399.
- Varki, A. & Lowe, J. B. (2009). Biological roles of glycans. U: Hart, Marth, Cummings, Varki (ur.). *Essentials of Glycobiology. 2nd edition: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- von Schaewen, A., Frank, J. & Koiwa, H. (2008). Role of complex N-glycans in plant stress tolerance. *Plant signaling & behavior*, 3(10), str. 871-873.
- Wang, W., Vinocur, B. & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, 218(1), str. 1-14.
- Yan, A. & Lennarz, W. J. (2005a). Two oligosaccharyl transferase complexes exist in yeast and associate with two different translocons. *Glycobiology*, 15(12), str. 1407-1415.
- Yan, A. & Lennarz, W. J. (2005b). Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *Journal of biological chemistry*, 280(5), str. 3121-3124.

- Zhang, F., Yang, Y., He, W., Zhao, X. & Zhang, L. (2004). Effects of salinity on growth and compatible solutes of callus induced from *Populus euphratica*. *In vitro cellular & developmental biology-plant*, 40(5), str. 491-494.
- Zhang, Y., Wang, Z., Huang, Q. & Shu, W. (2008). Phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ear organs is related to protein concentration in grains of winter wheat. *Journal of cereal science*, 47(2), str. 386-391.
- Zhang, M., Henquet, M., Chen, Z., Zhang, H., Zhang, Y., Ren, X., i sur. (2009). LEW3, encoding a putative α -1, 2-mannosyltransferase (ALG11) in N-linked glycoprotein, plays vital roles in cell-wall biosynthesis and the abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, 60 (6), str. 983-999.

8 ŽIVOTOPIS

ŠKOLOVANJE (KRONOLOŠKI OD NAJNOVIJEG PREMA NAJSTARIJEM)

Datum rujan 2019.
 Mjesto Zagreb, Hrvatska
 Ustanova Biološki odsjek, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu
 Zvanje profesor biologije

Datum srpanj 2001.
 Mjesto Zagreb, Hrvatska
 Ustanova Klasična gimnazija
 Zvanje SSS

RADNO ISKUSTVO (KRONOLOŠKI OD NAJNOVIJEG PREMA NAJSTARIJEM)

• **Datumi (od – do)** od 01.10.2017. do danas
 Ustanova zaposlenja EPTI, Švedska, Stockholm
 e-mail: contact@epti.com
 website: <http://www.epti.com>
 Naziv radnog mjesta Quality Assurance engineer

• **Datumi (od – do)** od 01.06.2011. do 01.10.2017.
 Ustanova zaposlenja HERMES CommuniAction, Zagreb, Republika Hrvatska
 e-mail: hermes.communiaction@gmail.com;
 website: <http://www.hermes-communiaction.hr>
 Naziv radnog mjesta projektni koordinator

• **Datumi (od – do)** od 01.10.2013. do 01.07.2014.
 Ustanova zaposlenja Restart, Zagreb, Republika Hrvatska
 e-mail: info@restarted.hr
 website: restarted.hr
 Naziv radnog mjesta voditeljica tehničkog odjela

• **Datumi (od – do)** od 01.10.2008. do 01.10.2013.
 Ustanova zaposlenja Kultura promjene, Kult TV, Zagreb, Republika Hrvatska
 website: sczg.hr
 Naziv radnog mjesta producent/izvršni producent